

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0045902

(43) 공개일자 2006년05월17일

(21) 출원번호 10-2005-0037546

(22) 출원일자 2005년05월04일

(30) 우선권주장 1020040037875 2004년05월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 이상열
경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호
조무제
경남 진주시 주악동 금호석류마을 101동 1302호
문정찬
경남 사천시 용현면 장송 892
박진호
경남 사천시 벌리동 주공아파트 206동 1402호
김선영
경남 진주시 호탄동 628-7번지
이영미
경남 진주시 지수면 청원리 491
전민규
경남 창원시 외동 대동아파트 403호
정지현
경남 진주시 칠암동 한주아파트 1309호

(74) 대리인 이종우

심사청구 : 있음

(54) 샤페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성결합체와 이의 용도

요약

본 발명은 다양한 환경 스트레스(열 충격, 병원균 및 산화적 스트레스) 및 알츠하이머 병 (Alzheimer disease), 파킨슨 병 (Parkinson disease), 유방암, 폐암, 자궁암, 간암 등에 의하여 페록시레독신 단백질 중 2개의 시스테인 (Cysteine)기를 소 유한 2-시스테인 페록시레독신 (2-Cys Prx)단백질이 저분자량의 구조로부터 고분자량의 단백질 구조로 변화되는 동시 에 퍼록시다제 기능으로부터 새로운 샤페론(chaperone) 기능으로의 기능적 전환을 하게 됨으로서 여러가지 환경스트레

스에 대한 저항력을 나타내는 성질을 입증하여, 다양한 스트레스 (열충격 및 병원균)에 대한 저항성 형질전환 식물체의 제조와 이 단백질의 특이항체 (specific antibody)를 이용한 여러 가지 암 질환 및 신경질환의 진단시약으로 이용하는 것이다.

특히, 새로이 밝혀진 2-시스테인 페록시레독신 (2-Cys Prx) 단백질의 사페론 기능은 폐암, 유방암, 전립선암 등 각종 암 환자의 조직에 특이하게 나타날 뿐만 아니라, 알츠하이머 병 (Alzheimer disease), 파킨슨 병 (Parkinson disease) 등 다양한 신경계통의 치명적인 질환에서 나타나는 특성이 있어, 이 단백질의 발현조절을 개발하여, 환경 스트레스에 내성을 가지는 형질전환 식물체 제조 및 응용에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 저분자량 및 고분자량의 2-시스테인 페록시레독신 (2-Cys Prx) 단백질 구조에 특이하게 결합하는 특이항체 (specific antibody)를 이용하여 폐암, 유방암, 전립선암 등의 암 질병을 가지는 환자의 암 진단시약 개발이나, 알츠하이머 병 (Alzheimer disease), 파킨슨 병 (Parkinson disease) 등의 신경계통 질환을 가진 환자에 대한 진단 및 치료시약으로 이용될 수 있는 효과가 있다.

대표도

도 9

색인어

2-시스테인 페록시레독신, 두가지 기능, 퍼록시다제, 사페론, 환경저항성, 형질전환 식물체, 진단시약

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 열 충격 스트레스에 대한 본래구조의 2-시스테인 페록시레독신 I과 시스테인 돌연변이 (Cysteine mutant) 형태의 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I 유전자가 각각 도입된 2-시스테인 페록시레독신 I 과 II의 결핍 효모 균주의 저항성을 나타낸 도면이고,

도 2는 퍼록시다제와 사페론의 두 가지 기능을 가진 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 아미노산 서열 배열과 단백질의 2차 구조를 비교하고, 효모에 존재하는 2-시스테인 페록시레독신 I의 사페론 활성을 나타낸 도면이고,

도 3은 2-시스테인 페록시레독신 I에 대해 분자량 크기별로 분리한 분리 크로마토그래피의 용출 흡광도와, 무변성-전기영동법으로 분리하고 염색한 젤, 및 전자 현미경으로 구조를 나타낸 도면이고,

도 4는 열 충격과 산화적 스트레스에 의해 조절되어지는 2-시스테인 페록시레독신 I의 두 가지 기능과 구조적 변화를 나타낸 도면이고,

도 5는 산화적 스트레스와 열충격에 의한 2-시스테인 페록시레독신 I 구조의 가역적 변화를 나타낸 도면이고,

도 6은 과산화수소의 전처리 유무에 따라서 2-시스테인 페록시레독신 I과 II가 모두 결여된 효모(Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II) 세포에서의 다양한 종류의 2-시스테인 페록시레독신 I 발현이 열충격과 단백질 용해도에 끼치는 영향을 나타낸 도면이고,

도 7은 애기장대의 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1) 형질전환체를 제조하기 위한 재조합 DNA 벡터와 형질전환된 애기장대의 스트레스 저항성을 나타낸 도,

도 8은 인간의 2-시스테인 페록시레독신 중 고분자 중합체를 인지하는 모노클로날 항체(monoclonal antibody)의 특이적 결합(immuno-specificity)과 2-시스테인 페록시레독신의 고분자 중합체가 다양한 암 질환세포에서 발현되는 현상을 나타낸 도면이고,

도 9는 2-시스테인 페록시레독신 I의 퍼록시다제와 사페론 활성의 산화적 스트레스-의존성 구조적 전환과 기능적 전환에 대한 생리적 특성의 메커니즘을 나타낸 도면이고,

도 10 은 열 충격 스트레스에 대한 본래구조의 인간 2-시스테인 페록시레독신 II의 사페론 활성을 나타낸 도면이고,

도 11은 단백질을 분자량 크기별로 분리하는 분리 크로마토그래피를 이용해 인간 페록시레독신 II의 구조와 두가지 기능, 퍼옥시다제와 사페론 기능의 관계를 나타낸 도면이고,

도 12는 인간 페록시레독신 II의 구조와 기능에 있어서 아미노 말단의 퍼옥시다제 활성을 나타내는 51번 시스테인과 카르복시 터미널이 미치는 영향을 나타낸 도면이고,

도 13은 헬라 세포 (HeLa cell)에서 인간 페록시레독신 II의 산화적 스트레스 의존적인 고분자량 복합체의 가역적 형성을 나타낸 도면이고,

도 14는 효모의 2-시스테인 페록시레독신 (cPrxI)과 비교해서 인간 페록시레독신 2가 효모에서 과산화수소 의존적인 구조적 변화가 어떻게 일어나는지 나타낸 도면이고,

도 15는 과산화수에 의해 유도되는 세포사멸에 있어서 헬라 세포를 인간 페록시레독신 2가 사페론 기능으로 보호하는지를 나타낸 도면이고,

도 16은 본 발명의 바람직한 일실시예의 진단키트의 분해도(A)와 스트립(B)을 나타낸 도면이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 사페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 2-시스테인 페록시레독신 단백질이 구조와 분자량이 다른 다양한 형태로 존재하고 저분자 단백질은 퍼옥시다제의 기능을 나타내며, 고분자 단백질은 분자적 사페론 기능으로 작용함을 보여주는 구조 및 기능적 특성을 이용하여, 신경퇴행적 장애, 다운 증후군, 유방암, 폐암 등과 같은 질병이나 노인성 치매에 의한 알츠하이머병 등과 같은 진단시약으로 이용하는 방법, 상기 질병의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 및 이 유전자를 식물체에 도입하여 단백질의 발현량을 조절함으로써 환경재해 내성 형질전환 동물체 또는 식물체 개발에 관한 것이다.

활성산소종(ROS)은 호기성 대사 과정이나 생물개체가 다양한 스트레스 조건에 노출되었을때 발생되어진다(Finkel T., Curr. Opin. Cell Biol. 15: 247-254, 2003). 이러한 활성산소종은 생물적 거대분자 (단백질, 지질, 핵산 등)의 산화적 기능저해나 구조변화 등의 심각한 피해를 주게되고 많은 질병의 원인이 된다 (Neumann et al., Nature, 424: 561-565, 2003). 모든 호기성 생물체들은 산화적 스트레스나 활성산소종에 의해 매개되어지는 단백질의 폴립 (denaturation)과 이러한 폴립으로부터 유도되어지는 단백질들의 응집 (aggregation)들로부터 자신들을 보호하기 위해 슈퍼옥사이드 디스무타제 (superoxide dismutase), 카탈라제 (catalase)와 같은 많은 종류의 다양한 항산화 단백질들을 가지고 있다(Bryk et al., Science, 295: 1073-1077, 2002). 또한 이들과 더불어서 열충격 단백질과 같은 다양한 형태의 분자적 사페론을 가지고 있다.

최근에 티오레독신을 전자주개로 하고 과산화수소와 퍼록시나이트라이트 (peroxynitrite) 그리고 유기 과산화수소물을 환원시키는 새로운 형태의 항산화 단백질인 티오레독신 의존성 페록시레독신은 대부분의 진핵세포와 원핵세포에서 발견되어졌다 (Chae et al., J. Biol. Chem., 269: 27670-27678, 1994). 비록 페록시레독신이 티오레독신 구조부분을 가지고 있는 단백질들과의 전체적인 아미노산 서열과의 유사성은 높지 않지만, 티오레독신 가족군으로 분류되어지고 있다. (Schroder et al., Protein Sci., 7: 2465-2468, 1998). 이중 페록시레독신 단백질은 보존된 시스테인 잔기의 수에 따라 원 (one) 시스테인 페록시레독신과 두(two) 시스테인 페록시레독신으로 분류된다. 페록시레독신은 과산화물 매개 신호전달과정을 조절한다는 보고와 더불어서, 세포의 증식, 분화, 면역반응, 성장조절, 암세포의 발전, 세포사멸과정, 그리고 정의되지 않은 많은 기능을 가지고 있다고 알려져 왔다 (Neumann et al., Nature, 424: 561-565, 2003; Hirotsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 12333-12338, 1999).

특히, 여러 가지 암환자(Noh et al., Anticancer Res., 21: 2085-2090, 2001; Yanagawa et al., Cancer Letter, 145: 127-135, 1999; Kinnula et al., J. Pathol., 196: 316-323, 2002; Chang et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 289: 507-512, 2001)와 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 픽병(Pick's disease), 다운신드롬(Down syndrome)과 같은 퇴행성 신경 질환환자에서 과발현 된다는 보고가 있다(Multhaup et al., Biochem. Pharmacol., 54: 533-539, 1997;

Krapfenbauer et al., Brain Res., 967: 152-160, 2003). 더욱이 암세포에서 이 단백질의 발현은 방사선 치료(Chen et al., J. Neurosci. Res., 70: 794-798, 2002)나 항암치료제(Nonn et al., Mol. Cancer Res., 1: 682-689, 2003)에 의해 유발되는 세포사멸(apoptosis)에 대한 저항성의 정도와 관련이 있다는 것이 알려졌다. 독성을 가진 활성산소종의 생성이 노화에 따른 퇴행성 신경질환의 발달 단계에서 일어나는 잘 알려진 결과이기 때문에 2-시스테인 페록시레독신을 포함하는 항산화 단백질들이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 과정에 관여한다고 알려졌다(Mu et al., J. Biol. Chem., 277: 43175-43184, 2002; Kim et al., J. Biol. Chem., 275: 18266-18270, 2000).

그러나, 지금까지 페록시레독신에 대해 많은 연구가 수행되어왔지만 세포내에서의 정확한 역할은 여전히 정확히 알려진 것이 없는 실정이다. 또한 글루타티온 퍼옥시다제와 카탈라제(catalase)같은 퍼옥시다제와의 활성도의 비교에서, 2-시스테인 페록시레독신이 가지고 있는 아주 낮은 활성효율과 과산화물에 의해서 쉽게 비활성된다는 사실(Yang et al., J. Biol. Chem., 277: 38029-38036, 2002)에서 2-시스테인 페록시레독신의 정확한 역할에 대해서 많은 의문점을 던져주고 있다.

그리고, 2-시스테인 페록시레독신은 마이토겐(mitogen)에 의해 활성화되는 단백질 키나아제(kinase)의 활성화(Veal et al., Mol. Cell., 15: 129-139, 2004)과 주요 전자 조절 인자의 하나인 엔에프-카파비(NF- κ B)의 활성을 조절한다고 알려져 있다(Kang et al., J. Biol. Chem., 279: 2535-2543, 2004; Barford et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 14: 679-686, 2004).

또한, 인간 적혈구세포와 크리티디아 파시쿨레이트(*Crithidia fasciculata*)에서 발견되는 2-시스테인 페록시레독신의 구조결정법에 의한 연구에서 2-시스테인 페록시레독신 구조가 다섯 개의 이중체(dimer)가 소수성결합(hydrophobic interaction)에 의해 높은 분자량(high molecular weight)을 가지는 구조를 형성한다고 보고 되었고(Schrder et al., Structure, 8: 605-615, 2000) 외부 조건에 의해 구조변화를 일으킨다고 보고 되었다. 2-시스테인 페록시레독신의 이러한 특징들을 볼때 이들은 잘 정돈된 결합체를 형성하고 이 결합체가 샤페론 활성을 가지는 작은 열충격단백질과 유사성을 가짐을 알 수 있다(Kim et al., Nature, 394: 595-599, 1998; Haley et al., J. Mol. Biol., 277: 27-35, 1998). 또한 다이설파이드 아이소머라제(protein disulfide isomerase)와 박테리아 티오레독신(thioredoxin), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase), 열충격 단백질(heat shock protein) 33 등과 같이 티오레독신 구조부위를 가지는 단백질들이 페록시레독신 단백질군이 아님에도 불구하고 샤페론 활성을 가진다는 많은 보고가 있었다(Wang, Methods Enzymol., 348: 66-75, 2002; Kern et al., Biochem. J., 371: 965-972, 2003; Jakob et al., Cell, 96: 341-352, 1999).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자는 상술한 근거하에 2-시스테인 페록시레독신이 샤페론 활성을 가질 수 있음을 예측하고, 2-시스테인 페록시레독신 유전자를 동물(인간 세포 유전자), 식물(arabidopsis thaliana), 미생물(효모)에서 각각 크로닝하여 대장균에서 발현시킨 다음 이들 유전자 산물인 단백질을 순수분리한 다음 이들에 대한 샤페론 활성을 측정하여, 이로부터 피검체의 질병 진단, 치료, 유전자 도입 및 발현조절에 의한 형질전환 식물체의 병 저항성 및 환경재해 내성에 관한 특성을 분석하고 이를 산업상에 이용하고자 하였다.

또한, 본 발명자는 동물, 식물, 미생물에서 분리한 유전자로부터 얻어진 단백질들의 구조적, 기능적인 특성이 모두 유사한 결과를 보였기 때문에 본 발명에서는 이들 모두에서 얻어진 결과를 중복하여 제시하지 않고 대표적으로 효모로부터 얻은 2-시스테인 페록시레독신(cPrxI)의 특성에 관해 기술하기로 한다(Prak et al., J. Biol. Chem., 275: 5723-5732, 2000). 그러나 이 경우, 미생물과는 다른 동물(인간세포 유전자)이나 식물에서 얻은 유전자와 2-시스테인 페록시레독신 단백질의 특성이나 성질은 본 발명에서 제시한 효모의 결과와 유사하다는 사실을 밝혀둔다.

따라서, 본 발명의 목적은 2-시스테인 페록시레독신이 티오레독신 접합부분을 가지고 있고 높은 분자량과 샤페론 활성을 가지는 복합체를 이용하여 피검체의 질병유무의 진단방법 및 진단 키트를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 병 저항성 및 환경 재해내성의 형질전환체를 제공하는 것이다

발명의 구성 및 작용

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동물, 식물 또는 미생물에 존재하는 2-시스테인 페록시레독신 단백질간의 결합으로 이루어지고, 사페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체를 제공한다.

또한, 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 11 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환체를 제공한다.

또한, 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 11 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 아그로박테리움 투머파시엔을 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 식물 세포주를 제공한다.

또한, 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 결합체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 제공한다.

또한, 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단일클론항체를 피검체의 시료와 면역반응시켜, 피검체의 시료 내 페록시레독신 결합체의 양을 측정하여 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법을 제공한다.

또한, 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피검체의 시료, 양성 및 음성대조구 시료를 무변형 전기영동법으로 단백질을 분리한 젤과; 상기 젤의 라인 수에 맞는 니트로셀룰로오스막을 다수 부착하고 콤 카드(comb card)와; 젤 상의 단백질을 전기적으로 니트로셀룰로오스막에 전이하는 전기장치와; 니트로셀룰로오스막 상에서 상기의 단일클론항체와; 상기 단일클론항체가 니트로셀룰로오스 막 상에 전이된 단백질과 인지할 수 있도록 배양트레이(incubation tray)를 포함하여 이루어지는 피검체의 질병 존재 유무를 진단하는 키트와;

상기의 단일클론항체를 고정상으로 갖는 반응부와 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부가 전개막상의 소정영역에 구비된 스트립; 및 상기 스트립을 수납하며, 적어도 피검체 시료를 투입하기 위한 시료 투입부와, 스트립상의 반응부와, 대조부에서의 반응결과를 육안 관찰하기 위한 표시창이 구비된 하우징을 포함하여 이루어지는 피검체의 질병 유무를 진단하는 키트를 제공한다.

나아가, 본 발명은 (a) 피검체에서 처리한 시료로 이루어지는 고정상 시료;

(b) 제 11 항 또는 제 12 항 기재의 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체를 항원으로 인식하는 단일클론항체; (c) 상기 항체와 특이적으로 결합하는 발색효소가 부착된 상보성 물질; (d) 발색효소와 반응하여 발색되는 기질 반응액; 및 (e) 반응 유지 완충용액과 배양용기를 포함하여 이루어지는 피검체의 질병유무를 진단하는 시약을 제공한다.

더 나아가, 본 발명은 서열번호 2, 4, 6 및 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 적어도 1종 이상 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질간의 결합으로 이루어지고, 사페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체 또는 그의 염을 유효성분으로, 약제학적으로 허용된 담체를 포함하여 이루어지는 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료하는 약제학적 조성물; 및

서열번호 2, 4, 6 및 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 인간 세포주에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환체(형질전환세포주)와; 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 이루어지는 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료하는 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명에서는 상기 질병은 유형으로 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 갑상선암, 심장암, 폐암, 종양, 열 충격(heat shock), 활성 산소종(reactive oxygen species), 간암, 유방암, 자궁암 또는 폐암 등을 포함한다.

본 발명에서는 대장균에 효모의 2-시스테인 페록시레독신 유전자(cPrx I)를 도입하여 형질전환된 대장균(*E.coli*/pGEX-cPrxI)을 2004년 5월 24일 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 10645BP를 부여받았다.

또한, 본 발명에서는 대장균에 인간의 2-시스테인 페록시레독신 유전자(hPrxII)를 도입하여 형질전환된 대장균(*E.coli*/pGEX-hPrxII)을 2005년 4월 25일 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 수탁번호 KCTC 10793BP를 부여받았다.

상기 기탁한 형질전환체는 벡터에 삽입된 페록시레독신 유전자를 온전하게 장기간 보관하기 위해 사용하는 데, 바람직하게는 냉동보관, 예를들어 액화질소에 적절한 보관용 완충용액과 함께 보관하여 사용한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다.

본 발명에서 사용되는 2-시스테인 페록시레독신 단백질의 결합체는 동물, 식물 또는 미생물 유래의 동종간 페록시레독신 단백질의 결합과 이종간 페록시레독신 단백질의 결합을 말하는 데, 동물, 식물 및 미생물에 존재하는 2-시스테인 페록시레독신은 각각 구조적, 기능적인 특성이 유사하므로, 이에 한정되는 것은 아니며 동물, 식물 및 미생물에 존재하는 대부분의 2-시스테인 페록시레독신을 사용할 수 있다.

다만, 본 발명에서 서열번호 2, 4, 6 및 8은 인간의 2-시스테인 페록시레독신의 이성질체를 나타내고, 서열번호 10은 아라비도스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)를 나타내고, 서열번호 11 및 12는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 나타내도록 하여 각각 동물, 식물 및 미생물을 대표하도록 한 것이다(서열목록 참조).

그리고, 본 발명에서 사용한 샤페론(chaperon)은 단백질의 접힘(folding)에 관여하는 단백질로, 일례로 단백질이 열 충격(heat shock)과 같은 스트레스를 받게 되면, 단백질은 제대로 접혀있던 3차원 구조가 풀리게 되어 자신의 역할을 정상적으로 수행할 수 없게 되는데, 샤페론(Chaperone)이라 명명된 그룹의 단백질들은 이렇게 풀려진 단백질들을 인식하고 결합해서, 이들이 다시 제대로 접힐 수 있는 좋은 환경을 만들어 주는 역할을 하는 단백질을 의미한다.

본 발명은 동물, 식물, 미생물의 세포질에 존재하는 페록시레독신 단백질 중 2개의 시스테인(Cysteine)기를 갖고 있는 2-시스테인 페록시레독신(2-Cys Prx) 단백질이 퍼록시다제의 역할뿐만 아니라, 이들의 결합체가 샤페론의 기능을 한다는 새로운 사실을 밝혀냄으로써, 2-시스테인 페록시레독신이 갖고 있는 샤페론 기능의 특성을 응용하는 방법에 관한 것이다.

이는, 페록시레독신의 고분자량 복합체에서 샤페론 기능이 우세하게 나타나기 때문인데, 이의 현상을 본 발명자는 노인성 질환이나, 각종 암 질환, 및 산화적 스트레스와 열충격 노출 등은 2-시스테인 페록시레독신(2-Cys Prx) 단백질 구조를 저분자에서 고분자 복합체로의 전환을 야기하며, 이러한 구조적 변화는 저분자의 단독 페록시레독신에서 주로 나타나는 퍼록시다제 기능에서 샤페론으로 기능적인 변환을 유발시킨 것으로 보고 있다.

또한, 상술한 기능적인 변환은 주로 효모인 경우 퍼록시다제 활성자리인 시스테인 47번 잔기(Cys47)와 인간의 경우 시스테인 51번 잔기(Cys51)의 변화에 의해 나타나는데, 이 잔기는 세포에서 효과적인 과산화수소의 인지자로서 작용하는 부위이므로, 2-시스테인 페록시레독신 단백질의 샤페론 기능은 생물체의 다양한 외부의 환경스트레스, 열충격, 산화적 스트레스, 다양한 인간의 질병)에 대한 저항성을 증가시키기 위한 작용으로 판단된다.

이와같은 메카니즘의 특성은, 본 발명에서 다양한 산화적 스트레스에 의하여 저분자량의 2-시스테인 페록시레독신 단백질이 고분자량의 단백질 구조로 변화되는 지와 변화된 고분자량의 단백질 구조가 퍼록시다제 기능에서 새로운 샤페론 기능으로 변환되는 가를 실험을 통해 확인하였으며, 이러한 구조적, 기능적 전환에 의하여 식물, 동물, 미생물들이 외부 스트레스에 강력한 저항성을 나타내게 된다는 것을 입증하였다.

따라서 상기 단백질 유전자를 도입하여 발현량을 조절할 경우 다양한 외부 스트레스에 저항성을 나타내는 환경스트레스 내성 형질전환 식물체나 미생물을 제조할 수 있으며, 이 단백질의 샤페론 기능을 추적함으로써 인간의 각종 질병 예를들어, 암, 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등의 진단방법 및 시약 개발에 응용이 가능한 것이다.

이는 2-시스테인 페록시레독신의 돌연변이나 탈락 등의 기능저하나 불능의 경우, 뇌신경퇴화(Krapfenbauer et al., Electrophoresis. 23: 2541-2547, 2002), 알츠하이머 병(Kim et al., J Neural Transm Suppl. 61: 223-235, 2001), 다

운신드롬(Krapfenbauer et al., Brain Res. 967: 152-160, 2003), 갑상선암(Yanagawa et al., Cancer Lett., 145:127-132, 1999), 심장암, 폐암(Kim et al., Cell Biol Toxicol. 19: 285-298, 2003.), 종양(Neumann et al., Nature. 424: 561-565, 2003) 등의 질병이 유발되는 공지된 사실에 의해 입증된다.

이와같이, 상술한 사페론 기능을 이용하면 다음과 같이 진단시약, 진단방법, 진단키트 및 약제학적 조성물 등의 적용에 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 진단방법은 구체적으로 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 11 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 선택된 단백질 간의 결합으로 사페론 활성을 갖는 페록시레독신 결합체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 단일클론항체를 사용하는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 인간의 2-시스테인 페록시레독신인 서열번호 2, 4, 6 및 8에 대응되는 단일클론항체를 사용한다.

이때, 상기 피검체의 시료는 사람, 동물, 식물, 미생물의 조직이나 체액에서 적출한 세포를 파쇄하거나 용융하여 수득한 단백질을 사용한다. 그리고, 상기 면역반응은 피검체의 시료를 무변성 전기영동(native-PAGE)으로 단백질을 분리하고 니트로셀룰로오스막 상의 일정 위치에 블롯팅한 다음, 블롯팅한 막 상에 특이적으로 결합하는 항체의 위치나 양을 효소나 염료로 염색하여 가시화함으로써, 시료 내 페록시레독신 결합체의 양을 측정하는 것이 바람직하다.

그리고, 구체적으로, 본 발명에서는 피검체에서 2-시스테인 페록시레독신 이성질체의 고분자 결합체 농도를 측정하여 질병 존재 유무를 판단할 수 있는 진단시약에 아래와 같은 구성성분이 포함되도록 하는 것이 바람직하다.

- (a) 피검체에서 처리한 시료로 이루어지는 고정상 시료;
- (b) 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체를 항원으로 인식하는 항체;
- (c) 상기 항체와 특이적으로 결합하는 발색효소가 부착된 상보성 물질;
- (d) 발색효소와 반응하여 발색되는 기질 반응액; 및
- (e) 반응 유지 완충용액.

이때, 본 발명에서 피검체는 체액에서 처리한 전혈, 혈청, 혈장, 림프액, 세포간액이나 장기 등의 조직 등을 의미하며, 상기 시료는 상기 피검체에서 분리/추출한 단백질을 말한다.

그리고, 본 발명에서는 구체적으로 상기 상보성 물질은 2-시스테인 페록시레독신 이성질체의 고분자 결합체와 특이적으로 반응하는 항체와 상기 항체를 인식하는 2차 항체를 반응시킨다. 2차 항체에 부착된 발색 효소는 퍼옥시데이스(peroxidase) 혹은 알칼라인 포스파테이스(alkaline phosphatase) 등을 사용하고, 상기 효소에 대응되는 기질 반응액(TMB, NBT/BCIP)을 사용하는 것이 바람직하다.

그러나, 본 발명은 상술한 방법으로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 2-시스테인 페록시레독신 이성질체의 고분자 결합체를 항원으로 인식하는 항체를 이용하여 상기한 다양한 질병을 검출할 수 있는 방법이라면 어떠한 방법을 사용해도 무방하다.

그리고, 상술한 표지물, 상보성 물질 및 발색효소는 상호간 결합 특이성이 높고 반응 친화력이 강하며, 극히 낮은 농도에서도 반응을 할 수 있는 민감성을 가진 것이라면 상술한 것 이외에 그 어떠한 것을 사용해도 무방하다.

또한, 본 발명의 다른 구체적인 바람직한 진단시약은 피검체의 시료를 무변성 전기영동(native-PAGE)으로 단백질을 분리하고 니트로셀룰로오스막 상의 일정 위치에 블롯팅한 다음, 블롯팅한 막 상에 특이적으로 결합하는 항체와 상기 항체의 위치나 양을 효소나 염료로 염색하여 가시화함으로써, 시료 내 페록시레독신 결합체의 양을 측정할 수 있도록, 웨스턴 블롯팅 세트와; 본 발명의 2-시스테인 페록시레독신 고분자 결합체와 특이적으로 결합하는 항체와 상기 항체에 부착된 발색효소; 및 기질반응용액을 포함하여 이루어진다(Jang et al., Cell. 117: 625-635, 2004). 신속하고 대량의 피검체 검사를 위한 방법으로 96-웰 또는 386 웰 플레이트(96-well or 386 well plates)를 사용한 엘리자(Elisa)방법을 사용할 수 있겠다(D'Ercole et al., J. Immunoassay Immunochem., 26: 43-56, 2005). 이 경우, 96 개나 386개의 피검체 시료를 단백질 부착이 용이한 폴리스티렌(polystyrene) 플레이트의 각 웰에 첨가하여 충분히 부착시킨 다음 워싱(washing) 작업을 하여 부착되지 않은 이물질을 제거시킨다. 이렇게 준비한 대량의 피검체가 부착된 플레이트에 고분자 형태의 페록시레독신 결합

체와 특이하게(specific) 반응하는 항체를 첨가하여 반응시킨다음 이뮤노블롯팅(immunoblotting) 방법에 의하여 신속하게 검사할 수 있다. 진단 방법은 고분자 형태의 페록시레독신 결합체와 특이하게(specific) 반응하는 항체와 상기 항체를 인식하는 2차 항체를 반응시켜 2차 항체의 발색정도를 이용하여 검사하게 된다. 2차 항체에 부착된 발색 효소는 퍼옥시데이스(peroxidase) 혹은 알칼라인 포스파테이스(alkaline phosphatase) 등을 사용하고, 상기 효소에 대응되는 기질 반응액(TMB, NBT/BCIP)을 사용하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명의 구체적인 진단 키트는 피검체의 시료, 양성 및 음성대조구 시료를 무변형 전기영동법으로 단백질을 분리한 젤과; 상기 젤의 라인 수에 맞는 니트로셀룰로오스막을 다수 부착하고 콤 카드(comb card)와; 젤 상의 단백질을 전기적으로 니트로셀룰로오스막에 전이하는 전기장치와; 니트로셀룰로오스막 상에서 제 11 항 또는 제 12 항 기재의 단일클론항체와; 상기 단일클론항체가 니트로셀룰로오스 막 상에 전이된 단백질과 인지할 수 있도록 배양트레이(incubation tray)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무를 진단하는 키트를 제공하는 데, 이때, 통상적으로 웨스턴 블랏의 방법을 적용하고, 상기 전이된 시료의 단백질과 결합한 항체를 인식하는 방법은 통상의 ELISA 방법에 의해 발색효소를 사용하는 것이 바람직하다.

또한, 다른 진단키트의 형태로는 도 16에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따라 제조한 항체를 고정상으로 갖는 반응부(11)와 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부(12)가 전개막(13)상의 소정영역에 구비된 스트립(1); 및

상기 스트립(1)을 수납하며, 적어도 피검체 시료를 투입하기 위한 시료 투입부(21)와 스트립상의 반응부(11)와 대조부(12)에서의 반응결과를 육안 관찰하기 위한 표시창(22)이 구비된 하우징(2)을 포함하여 이루어진다.

이때, 상기 키트로 부터 질병의 존재 유무와 이의 농도는 통상의 ELISA 방법을 이용한 흡광도를 통하여 비교, 측정하여 결정한다.

한편, 본 발명에서는 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제조한다.

구체적인 바람직한 예로는 상술한 바와 같이, 인간의 2-시스테인 페록시레독신 이성질체의 고분자 결합체 또는 그의 염을 유효성분으로, 약제학적으로 허용된 담체를 포함하여 이루어지는 데, 이때, 본 발명에 따른 2-시스테인 페록시레독신 이성질체의 고분자 결합체는 그 자체를 사용하거나 약제학적으로 허용이 가능한 산부가염 또는 금속 복합체, 예를들어 아연, 철 등과 같은 염의 형태로 사용할 수 있다.

좀 더 구체적으로 산부가염은 염화수소, 브롬화수소, 황산염, 인산염, 말레산염, 아세트염, 시트로산염, 벤조산염, 숙신산염, 말린산염, 아스코로브산염, 타르탈산염을 사용하는 것이 바람직하다.

이때, 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적인 방법으로, 투여방법, 투여형태 및 치료목적에 따라 상기 유효성분을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 혼합하여 희석하거나, 용기 형태의 담체내에 봉입시키는 것이 바람직하다.

상기 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 염수, 완충제, 텍스트로즈, 물, 글리세롤, 링거액, 락토즈, 수크로즈, 칼슘 실리케이이트, 메틸 셀룰로오스 및 에탄올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1종 이상의 담체를 사용하여 경구투여와 비경구투여용으로 분말, 과립, 주사액, 시럽, 용액제, 정제, 좌약, 폐사리(pessaries), 연고, 크림 또는 에어로졸 등과 같은 제형으로 제조한다. 다만, 본 발명의 담체가 상기의 담체로 한정되는 것은 아니다.

이때, 비경구 투여는 경구 이외에 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강, 흡입 등을 통해 약제의 투여를 의미한다.

그리고, 상기 제형에 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함하여 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 제형화할 수 있다.

또한, 본 발명에서 다른 구체적인 약제학적 조성물의 예로는 인간 2-시스테인 페록시레독신 이성질체 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 인간 세포주에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환체(형질전환세포주)와; 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 주사제의 형태로 사용하는 것이 바람직하다.

그리고, 본 발명의 투여량은 환자의 상태, 투여 경로 및 투여 형태에 따라 조절될 수 있어 한정되지 않으며 증상에 따라 신체에서 탈감작하지 않는 범위 내에서 사용할 수 있으나, 통상적으로 본 발명의 유효성분인 2-시스테인 페록시레독신 및 그의 염의 사용량은 인간내 페록시레독신 단백질이 혈중에서 두, 세 번째로 많은 단백질이고(Moore et al., J. Biol. Chem.

266: 18964-18968, 1991) 동물 세포에서 수용성 단백질의 0.1-0.8%를 차지한다고 알려진 사실을 감안하여 판단할 때 (Chae et al., Diabetes Res. Clin. Pract. 45: 101-112, 1999), 체중 1kg 당 10~2,000mg을 하루에 연속적 또는 간헐적으로 투여한다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 하지만 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이들 실시예의 범위가 본 발명에 국한되지는 않는다.

또한, 반복적인 설명인 경우에는 생략한다.

[실시예 1] 열 충격에 대한 세포내 본래 구조의 2-시스테인 페록시레독신 I 과 퍼옥시다제-비활성 구조의 2-시스테인 페록시레독신 I 의 저항성

2-시스테인 페록시레

독신 I (cPrxI)의 생리활성 조절 기능을 연구하기 위하여 와일드 타입(wild type) 효모에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)과 II가 결합된 돌연변이 효모(Δ 2-시스테인 페록시레독신 I과 II: cPrxI/II) 균주를 제조하여 준비하였다 (Kang et al., J. Biol. Chem., In press 2003).

그리고 pRS416 플라스미드에서 자신의 프로모터에 의해 조절되는 본래구조(native)의 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)과 시스테인이 결합된 2-시스테인 페록시레독신 I(C47/170S-cPrx1) 유전자를 상기 준비된 돌연변이 효모 균주에 도입하여 본래구조(native)의 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 시스테인이 결합된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI) 단백질을 발현하는 돌연변이 효모 균주를 제조하였다.

도 1의 A는 본래구조(native)의 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)과 시스테인이 결합된 2-시스테인 페록시레독신 I 유전자가 도입된 각 돌연변이 균주에서 상기 유전자를 발현시켜 추출한 본래구조와 시스테인이 결합된 2-시스테인 페록시레독신 I 단백질에 티오레독신(thioredoxin)을 각각 반응시켜 티오레독신-의존성 퍼옥시다제 (peroxidase)의 활성을 비교하여 나타낸 것으로 시스테인이 결합된 2-시스테인 페록시레독신 I은 거의 퍼옥시다제의 활성이 없음을 알 수 있었다.

그리고, 상기 제조된 돌연변이 효모 균주들을 지수기 (exponential phase) 까지 배양하고, 동일한 밀도의 효모균주 (10 μ l)를 $10^1 \sim 10^5$ 배까지 순차적으로 희석하여 와이피디 (YPD) 고체 배지에 점적하고, 43°C에서 30분간 열 충격을 준 다음 4일동안 배양하였다.

이의 결과, 놀랍게도 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I과 II(Δ cPrxI/II) 균주에서 퍼옥시다제 활성이 없는 시스테인 47과 170이 세린으로 바뀐 돌연변이 cPrx I (C47/170S-cPrx1)이 발현될때, 이 균주도 열 스트레스로부터 저항성을 갖는 것으로 나타났다(도 1-B참조).

이때, 도 1-B에서 1은 야생형 효모, 2는 2-시스테인 페록시레독신 I과 II가 결합된 돌연변이 균주(Δ 페록시레독신 I (cPrxI/II)), 3은 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI/II) 돌연변이 효모에 자기 자신의 프로모터 조절을 받는 본래구조의 (native)-2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)을 발현시킨 동질 유전자 돌연변이체, 4는 Δ cPrx I /II 돌연변이 효모에 자기 자신의 프로모터 조절을 받는 C47/170S-cPrx I 을 발현시킨 동질 유전자 돌연변이체를 사용하였다.

이는 열 충격으로부터 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I과 II (Δ cPrxI/II) 균주를 보호하기 위한 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 능력이 퍼옥시다제 활성 때문이 아니라는 것으로서 최소한 저항성의 일부는 이 단백질의 아직까지 알려지지 않은 다른 기능에 의해 나타나는 것임을 의미하는 것이다.

따라서, 상기 결과는 항산화 기능과 관련없이 여러 가지 세포내 현상에 관여하는 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 또 다른 기능을 규명하기 위한 실마리를 제공하는 단서가 되었다.

[실시예 2] 퍼옥시다제와 샤페론의 두가지 기능을 가진 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI) 단백질의 특성

도 2는 퍼옥시다제와 샤페론의 두 가지 기능을 가진 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 아미노산 서열 배열과 단백질의 2차 구조를 나타내는 것이다.

이때, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 아미노산 서열은 클러스터 (Clustal) 방법에 의해서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 상동체와 비교하였고, 2차 구조는 엔피에스 서버 (NPS@server) 상의 고르 IV (GOR IV) 예측 도구를 사용하고 예측하고자 하였다.

그리고, 도 2의 A에서 화살표는 베타-시트(β -sheet), 원통은 알파-헬릭스(α -helix), 선 표시는 임의의 코일, 검은색 박스는 퍼록시다제 기능을 위해 필수적인 두개의 보존된 시스테인기, 별 표시는 완전하게 보존된 잔기, 및 점 표시는 잘 보존된 잔기를 의미하며, 오른쪽 숫자는 아미노산 번호를 표시한다

그리고, 사용된 유전자 은행 (GeneBank)의 유전자 번호는 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)(NP_013684), 2-시스테인 페록시레독신 II(cPrxII)(NP_010741, HsPrx I (NP_002565), HsPrx II (NP_005800), 그리고 *Atbas1* (NP_187769)를 사용하였다.

이 결과, 두개의 시스테인을 가진 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 복합적 염기서열과 구조에 기초한 정렬은 박테리아 샤페론 HSP33(heat shock protein33)과 유사하게 잘 보존된 시스테인 잔기뿐만 아니라 샤페론 활성(Jakob et al., 1999; Kern et al., 2003)을 나타낸다고 알려진 티오레독신 모티프를 가지고 있음을 알 수가 있었다(도 2-A 참조).

또한, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 II가 결여된 돌연변이 효모(Δ 2-시스테인 페록시레독신 I과 II: Δ cPrxI/II) 균주가 열 충격에 저항성을 가질수 있게 한 2-시스테인 페록시레독신 단백질의 새로운 기능을 규명하기 위해, 상기 단백질의 기질인 시트레이트 신타아제(citrate synthetase; CS)의 열에 의한 응집을 억제하는 능력을 측정함으로써, 다섯 종류의 효모 페록시레독신의 샤페론 활성을 측정하였는데, 2-시스테인 페록시레독신 단백질과 기질로 시트레이트 신타아제를 사용하고, 이를 43°C가 유지된 분광 광도계 셀에서 응집 정도를 빛의 산란도로 측정하였다.

이때, 검은색 동그라미는 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)만 포함된 혼합물, 검은색 삼각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제 (CS)와 2 μ M BSA가 포함된 혼합물, 하얀색 사각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 2 μ M 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)가 포함된 혼합물, 검은색 사각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 2 μ M 2-시스테인 페록시레독신 II (cPrxII)가 포함된 혼합물, 및 하얀색 삼각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 2 μ M cPrxIII, mPrx, nPrx이 각각 포함된 혼합물을 사용하였다.

이의 결과, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 II는 43°C에서 시트레이트 신타아제의 열에 의한 응집을 효과적으로 억제한 반면, 효모의 다른 아이소타입의 페록시레독신과 소혈장 단백질(BSA)은 시트레이트 신타아제(CS)의 응집을 억제하지 못하는 것을 알 수 있었다(도 2B 참조).

또한, 2-시스테인 페록시레독신을 농도별로 시트레이트 신타아제와 혼합하고, 이를 43°C가 유지된 분광 광도계 셀에서 응집 정도를 빛의 산란도로 측정한 결과,

2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI) 단백질 양의 증가에 따라 시트레이트 신타아제(CS)의 응집은 더욱 감소 되었고, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 시트레이트 신타아제(CS)의 분자 비율이 2:1일때에는 시트레이트 신타아제(CS)의 응집이 완전하게 억제되었다(도 2C 참조).

이때, 도 2-C 에서 검은색 동그라미는 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)만 포함된 혼합물, 하얀색 삼각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 0.25 μ M 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)이 포함된 혼합물, 검은색 삼각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 0.5 μ M 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)이 포함된 혼합물, 하얀색 사각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제 (CS)와 1 μ M 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)이 포함된 혼합물, 및 검은색 사각형은 1 μ M 시트레이트 신타아제(CS)와 2 μ M 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)가 각각 포함된 혼합물을 사용하였다.

그리고, 상기 도 2-C와 같이, 2-시스테인 페록시레독신 I 을 농도별로 1 μ M의 인슐린과 혼합하고, 이를 25°C가 유지되는 분광 광도계 셀에서 샤페론의 활성을 측정하였다. 이의 결과, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)은 DTT에 의해 유도되는 인슐린의 베타 사슬의 침전을 효과적으로 보호할 수 있음을 알 수 있었다(도 2D 참조).

그리고, 상기 분석 조건 하에서 본 발명의 2-시스테인 페록시레독신 I 과 공지된 샤페론 단백질인 메타노코커스 야나스치 (*Methanococcus jannaschii*; Kim et al., Nature, 394: 595-599, 1998)의 HSP16.5와 알파 크리스탈린(α -crystallin)의 샤페론 활성을 비교한 결과, 2-시스테인 페록시레독신 I보다 각각 15배, 3배 약한 활성을 보였고(미도시), 1 몰(mole)의

시트레이트 신타아제(CS)를 보호하기 위해서는 염소의 튜불린(tubulin)의 경우 8배와 C. 엘레간스(C. elegans)의 HSP16은 14-15배의 몰(moles)이 필요하다는 것이 보고 되어진 사실로부터(Manna et al., J. Biol. Chem., 276: 39742-39747, 2001) 2-시스테인 페록시레독신 I의 샤페론 활성이 아주 효율적이고 우수하다는 사실을 입증하였다.

또한, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 변형된(non-native) 기질과의 상호작용은 아미노 아실(aminoacyl) 잔기(Sharma et al., J. Biol. Chem., 273: 8965-8970, 1998)의 소수성 부위에 결합하는 비스에앤에스(Bis-ANS) 형광 물질을 사용하여 370nm에서 흥분과 400~600nm에서 조사된 방출량으로 측정하였다.

이의 결과, 비스에앤에스(Bis-ANS)가 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)에 결합할 때, 최고 방출파장은 약 520nm에서 더 짧은 파장인 ~470nm까지 이동하는 것을 알 수 있었다(도 2E 참조).

또한, 형광 세기는 열처리에 의해 크게 증가하는 데 이는 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 많은 소수성 부위가 열처리에 의해 노출됨을 의미하는 것인데,이로부터 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 II가 퍼록시다제로서 뿐만 아니라 효과적인 샤페론으로서 작용한다고 추정된다.

그리고, 본 발명의 2-시스테인 페록시레독신과 공지된 종래의 샤페론 단백질은 아미노산 서열과 많은 유사성을 가지지 않기 때문에 새로운 샤페론 집단으로 분류될 수 있음을 알 수 있었다.

[실시예 3] 다양한 분자량을 가진 고분자 단백질 구조의 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI) 단백질

샤페론의 가장 큰 특징은 단백질이 가역적으로 이중체, 삼중체, 그리고 고 중합체로 결합한다는 것이다(Hendrick et al., Annu. Rev. Biochem., 62: 349-384, 1993). 특히 많은 작은 열충격 단백질(sHSPs)은 생체내에서 고분자량 복합체를 형성한다고 알려져 있는데 이것은 샤페론 활성을 위해 꼭 필요한 특성이다(Haley et al., J. Mol. Biol., 277: 27-35, 1998). 그리고 인간의 NKEF, AhpC, 칼프로모틴(calpromotin), HBP23 그리고 Prx-B를 포함하는 여러 가지 페록시레독신 단백질들은 230~500kDa (Schroder et al., 2000; Hirotsu et al., 1999)의 분자량을 가지기 때문에, 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 이용하여 정제된 효모 2-시스테인 페록시레독신 I의 분자량을 측정하였다.

이때, 분리크로마토그래피는 TSK4000W_{XL} 컬럼(Tosoh, Japan)과 용출 완충용액 100 mM NaCl을 포함한 50 mM Hepes를 사용하였고, 상기 분리크로마토그래피로부터 분리된 세 분획(F-I, F-II, F-III)은 무변성 전기영동법, 그리고 전자현미경에 의해 분석하고자 하였다.

이때, 상기 무변성 전기영동법은 각 분획을 10% 무변성-전기영동법(native-PAGE; 위쪽 패널)과 12% SDS 첨가 변성 전기영동법(아래쪽 패널)상에서 분리한 후 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI) 항체를 사용하여 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다.

이 결과, 2-시스테인 페록시레독신 I, II가 다른 크기의 고분자량 단백질 복합체를 형성(도 3A 참조)하고 있는 반면 효모 내에 있는 다른 페록시레독신 아이소폼(Prx isoform)인 페록시레독신 III, mPrx와 nPrx는 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에서 단일 혹은 이합체의 위치에 나타났다. 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로 분리한 2-시스테인 페록시레독신 I복합체의 분자량은 표준 단백질과 비교할 때 약 40~1,000kDa 이상의 분자량대에 분포한다. 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에서 얻은 각각의 단백질 분획의 크기는 무변성-전기영동법(native-PAGE)하여 웨스턴 블러팅(western blotting)으로 다시 분석하였다. 다양하게 퍼진 단백질 복합체의 복잡한 형태는 2-시스테인 페록시레독신 I-특이적 항체에 의해 각 단백질 분획에서 검출되었다(도 3B, 위쪽 패널). 가장 큰 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI) 복합체가 포함된 첫 번째 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography) 분획의 단백질 분자량은 10% 무변성-전기영동법(native-PAGE)의 포어(pore)을 통과하기에 너무 커서 분리하는 겔의 상단 부분에 남아있는 반면에, 마지막 분획은 40~120kDa의 분자량을 가지는 단백질 혼합물을 포함하고 있는 것을 알 수 있었다.

그리고, 무변성-전기영동법(native-PAGE) 분석과는 달리, 모든 분획들의 SDS 첨가 변성 전기영동법(SDS-PAGE) 분석은 단량체 크기인 23kDa의 분자량을 가진 단일 밴드를 나타내었다(도 3B, 아래 패널). 이런 현상들은 자연적인 조건에서 2-시스테인 페록시레독신I가 다양한 수로 이루어진 동일다량 복합체(homo-polymeric complex)들로 존재함을 보여주고 있다.

또한, 2-시스테인 페록시레독신 I의 소중합체 구조(oligomeric structures)를 분석하기 위해 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피로부터 분리된 단백질을 2% 우라닐 아세테이트로 음화 염색한 다음, 전자 현미경(electron microscopy)으로 분석하였다.

이의 결과, 음성적으로 염색된(negatively stained) 단백질 분획의 EM은 세가지 다른 형태 즉, 구 모양(spherically-shaped)과 링 모양(ring-shaped)의 구조뿐만 아니라 불규칙적인 모양의 작은 입자로 보였다(도 3C 참조). F-I 분획에서 관찰된 구 모양의 입자(particles)는 평행적(translationally), 회전적(rotationally)으로 배열되었고 고유방향량-고유값(eigenvector-eigenvalue) 결과 분석을 기초하여 3개의 그룹(group)으로 분류 할 수 있었다(도 3D: F-I 참조). 투영된 이미지의 평균적인 모양은 22에서 28nm의 직경을 가지는 구모양을 나타내었고 이것의 크기는 2-시스테인 페록시레독신 I 분자의 수에 따라 다양하다. F-II 단백질의 소중합체 구조(oligomeric structures) 또한 전자 현미경과 이미지 처리에 의해 결정되었다(도 3D: F-II). 격자(grid)의 방위(orientation)에 의존한 F-II 분획의 EM은 두 가지 기본 모양 즉, 말단(end-on)의 방위를 가지는 링(ring) 모양 구조(F-II, 1-4)와 측면(side-on) 방위를 가지는 이중점(double-dot) 구조(F-II, 5-8)가 관찰되었다. 이때, 말단 방위의 잘 염색된 총 409개의 조각은 평행적(translationally), 회전적(rotationally)으로 배열되었고 통계상(statistical)의 다변량(multivariate) 해석(van Heel et al., Ultramicroscopy, 6: 187-194, 1981)이 수행되었다. 그런다음, 이들의 구조를 분류하기 위해서 네 개의 가장 중요한 고유 방향량(eigenvector)를 선택했다(Durr., Ultramicroscopy, 38: 135-141, 1991).

상기 결과에 의해 2-시스테인 페록시레독신 I은 특징의 유사성에 따라 세가지 종류로 규정되었다. 즉, 말단 방위(end-on view)의 비대칭 평균은 5배 좌우대칭(symmetry)을 나타내었고, F-II 복합체의 말단 방위 모양의 평균 이미지는 그것의 중심에서 무거운 염색 축적을 가진 하나의 링에 배열된 매스(mass)의 5개 중심을 나타내었다(F-II, 4). 링과 중심 구멍의 직경들은 각각 14 nm와 15 nm였다. F-II 복합체의 170개의 측면 모양들의 평균 이미지는 도 3D에서 보여주고 있다(F-II, 8). 이 평균은 복합체 수평면을 가로지르는 동일한 분포의 질량을 가진 이중점 구조를 보였다. 첫 번째와 두 번째 분획의 단백질 구조와 다르게, 마지막 분획(도 3C: F-III)에서의 단백질들은 규칙적인 구조를 형성하지 않았다. F-III의 분자 크기는 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)와 무변성-전기영동법(native-PAGE) 분석을 통해 2-시스테인 페록시레독신 I이 이합체나 사합체로 구성됨을 알 수 있었다.

[실시에 4] 외부 환경스트레스(열충격 및 산화적 스트레스)에 의한 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrx I)의 구조적 변화 및 기능적 전환

2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)은 40에서 1,000 kDa 크기의 고분자량 복합체를 이루며 퍼록시다제와 사페론 기능을 수행하기 때문에 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의해 분리된 3가지 단백질 분획에서 2가지 기능의 특징적인 활성을 조사하였다. 각 분획의 단백질 구조들이 안정한지 실험하기 위해 단백질 분획들을 도 3A에서 설명한 같은 조건하에 재크로마토그래피(re-chromatography)를 수행하였다. 그 결과, 단백질들은 첫 번째 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에서와 거의 같은 용출 시간에서 추출되어짐으로서 단백질 구조들이 안정하다는 것을 알 수 있었다(도 4A-a 참조). 또한, 세 종류 분획들의 퍼록시다제와 사페론 활성을 조사하였을 때, 가장 큰 분자량의 단백질 복합체(F-I)는 오직 사페론 활성만을, 가장 작은 분자량의 분획(F-III)에서는 퍼록시다제 활성만이 나타났으며, 반면에 중간 크기의 단백질(F-II)은 전체 단백질처럼 퍼록시다제와 사페론 활성 모두를 나타내었다(도 4A-b 참조). 이 결과들은 단백질 복합체의 거대분자 형성은 사페론 활성을 촉진시키고, 복합체의 저분자량 종들로의 분리는 퍼록시다제 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고, 각 단백질 분획에 비스에앤에스(Bis-ANS) 결합 분석에 의해 다시 검증되었다. 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 분자량이 높아지면 높아질수록 단백질에 결합되어진 비스에앤에스(Bis-ANS)의 양은 점점 많아진다(도 4A-b 참조).

따라서, 2-시스테인 페록시레독신 I의 두가지 기능은 특징적인 단백질 구조와 관련 있다고 결론지을 수 있다.

또한, sHSP는 열충격 대해 고분자 복합체를 형성함으로써 사페론 활성을 나타낸다(Haley et al., J. Mol. Biol., 277: 27-35, 1998; Hendrick et al., Annu. Rev. Biochem., 62: 349-384, 1993). sHSP와 같이 본래구조의(native)-2-시스테인 페록시레독신 I의 단백질 구조와 기능은 다양한 온도에서 30분 동안 배양했을때 현저하게 변화되었다(도 4B-a 참조). 즉, 배양 온도의 증가에 따라, 저분자량 단백질 분획의 양은 감소함과 동시에 고분자량 단백질 피크(peak)는 크게 증가되었고, 이는 열자극이 주어지는 동안 저분자량 단백질들은 보다 높은 분자량의 복합체로 모여진다는 것을 의미한다.

그리고, 전 실험을 통하여 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I(C47/170S-cPrxI)단백질 또한 열충격에 의해 고분자의 복합체를 형성함을 보였다.

이때, 열 충격에 의한 단백질의 사페론과 퍼록시다제의 상대적 활성은 25℃에서 측정한 2-시스테인 페록시레독신 I의 활성을 비교하여 상대적인 값을 나타내었다.

이의 결과, 구조적 변화와 함께 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 사페론 활성은 열처리에 따라 크게 증가하였다(도 4B-b 참조). 즉, 55℃에서 65℃로의 온도 증가는 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 사페론 활성을 약 3배 증가시켰고, 75℃에서는 약 30배 이상으로 크게 증가되었다. 반면에 열처리된 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 퍼록시다제 활성은 온도 증가에 따라 점차적으로 감소되어 75℃에서 30분 배양했을 때 퍼록시다제 활성은 거의 나타나지 않았다.

그리고, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 구조적이고 기능적인 변화는 시험관내에서 티오레독신(Trx), 티오레독신 리덕타제(TR) 그리고 NADPH를 포함한 티오레독신 체계의 존재하에서 과산화수소를 처리했을 때에도 나타나는 것을 알 수 있었다(도 4C 참조). 2mM 이상의 과산화수소가 존재할 때, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 사페론 활성은 약 10배 증가되었고, 퍼록시다제 활성은 크게 감소되었다(도 4C-a 참조). 그러나, 온도-의존적 조절과는 다르게, 과산화수소에 매개되는 전환 과정은 2-시스테인 페록시레독신 I 단백질이 티오레독신 체계를 이용했을 때에만 나타나고, 반면에 C47S(시스테인 47이 세린으로 바뀐 돌연변이) 또는 C47/170S(시스테인 47과 170이 세린으로 바뀐 돌연변이)인 2-시스테인 페록시레독신 I 단백질은 같은 실험조건에서 과산화수소 영향을 볼 수 없었다. 이것은 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 Cys47 잔기와 티오레독신 체계가 과산화수소 의존적으로 사페론 활성을 조절하는데 절대적으로 필요함을 의미한다.

그리고, 2-시스테인 페록시레독신 I에 과산화수소를 10분동안 처리한 후 그 구조를 티오레독신 시스템의 유무상태에서 각각 무변성-전기영동법(native-PAGE)과 웨스턴 블로팅(wester blotting)으로 분석하여 2-시스테인 페록시레독신 I의 과산화수소 의존적인 구조적 변화를 확인하고자 하였다. 이의 결과, 비생리적인 조건에서 열충격에 의한 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)활성의 생체외 조절은 산화적 스트레스에 의해 조절되는 경로와 비교하여 부분적으로 다른 경로에 의해 조절된다고 할 수 있다(도 4C-b 참조).

사페론들은 비정상적인 응집을 방지하기 위해서 변성된 기질과 물리적으로 결합한다고 보고되었기 때문에(Hendrick et al., Annu. Rev. Biochem., 62: 349-384, 1993), 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)이 부분적으로 변성된 단백질들과 어떻게 결합하는지를 관찰하였다. 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 소수성 부분이 25℃에서 노출(도 2E 참조) 될지라도 시트레이트 신타아제(CS)는 전혀 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 결합하지 않았는데, 이는 시트레이트 신타아제(CS)가 이 온도에서 원래 형태를 유지하기 때문이다(도 4D-a와 b 참조). 그러나 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)을 43℃에서 30분 동안 배양한 후 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 수행했을 때, 가장 높은 분자량의 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 함께 추출된 시트레이트 신타아제(CS)의 양이 크게 증가되었음을 관찰하였다. 이것은 결합되지 않은 시트레이트 신타아제(CS) 자체의 양의 감소와 일치되었다. 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 시트레이트 신타아제(CS)의 단백질 단위체(subunit)들은 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)로부터의 가장 큰 분자량 분획에서 확인된 것과 같이, 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 변성된 시트레이트 신타아제(CS) 단백질의 물리적인 결합은 SDS 첨가 변성 전기영동법(SDS-PAGE)로 증명하였다(도 4D-c와 d 참조). 반면에 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)이 없는 상태에서 43도에서 30분동안 전배양한 시트레이트 신타아제(CS)는 거의 침전되었고 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에서 단백질 피크는 나타나지 않았다.

이와 같이 두가지 기능을 나타내는 2-시스테인 페록시레독신 I이 퍼록시다제 활성에 필수적인 보존된 시스테인 잔기가 사페론 활성에도 필요한지를 연구하였다. 퍼록시다제 활성이 없는 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I(도 1A)의 사페론 활성은 본래구조의 단백질 2-시스테인 페록시레독신 I의 약 90%정도를 나타내었고(도 4E 참조), 2-시스테인 페록시레독신 I의 시스테인 잔기는 시험관내에서의 사페론 활성을 나타내는데 중요하지 않음을 제시하였다.

[실시예 5] 생체내에서 2-시스테인 페록시레독신 I의 구조변화의 특성

페록시레독신들의 퍼록시다제 활성이 세포내 과산화물의 생성에 의해서 빠르게 비활성화 되어진다는 보고(Yang et al., J. Biol. Chem., 277: 38029-38036, 2002)에 근거하여, 우리는 산화적 스트레스와 열충격에 대한 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 구조적 변화를 정상적인 효모와 돌연변이 효모를 이용하여 생체내에서 분석하고자 하였다.

이를 수행하기 위하여, 도 5의 A는 지수함수적(logarithmic phase)으로 성장한 효모 세포들을 3개의 동일한 분획으로 나누는 다음, 과산화수소를 처리순서를 달리하였고, B와 D는 A의 효모세포를 30분간 배양 후, 야생형, $\Delta\text{trx1}/2$, Δsrx1 , 그리

고 2-시스테인 페록시레독신 I^{C47S} 또는 2-시스테인 페록시레독신 I^{C170S}를 각각 발현시킨 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)과 II가 모두 결여된 효모로부터 추출한 단백질을 무변성-전기영동법 (native-PAGE) 와 2D-gels로 분리한 후, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)에 대한 항체로 이뮤노블로팅 (immunoblotting)을 수행하였다.

그리고, C는 산화된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI) (Ox)과 환원된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)(Re)의 2D 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하였다. 사진과 각각의 등전점이 각각 4.7과 4.9임을 보여준다.

그리고, E는 과산화 스트레스(95% 산소, 5% 이산화탄소)를 처리한 야생형 효모에서 분리한 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 이뮤노블롯(immunoblot)을 수행하였으며, 이 스트레스의 회복기간은 1시간으로 하였다.

또한, F는 1mM 과산화수소가 없는 조건(a)과 있는 조건(b)하에서 10분간 전처리한 야생형(wild type) 효모로부터 분리한 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)단백질의 구조를 전자현미경으로 확인하였다.

그리고, G는 야생형 효모에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)이 고분자 복합체를 형성하는데 있어서 열충격과 산화적 스트레스가 미치는 영향. 열충격, 과산화수소, 그리고 열충격과 과산화수소를 함께 처리한 효모로부터 분리한 단백질을 무변성-전기영동법 (native-PAGE) 하여 이뮤노블로팅(immunoblotting)수행 한 것이고, H는 효모 세포에서 열충격과 산화적 스트레스에 의해 생성된 활성산소의 양 측정결과. 세포에서 생성된 활성산소의 양을 측정하기 위하여 1mM 2,7-DCFH-DA와 반응시켜서 동일한 초점의 형광현미경으로 분석하여, 각 그룹의 200개 세포로부터 상대적 세기(Rel. int.)를 계산하여, 빛과 DCF형광 영역을 위, 아래 패널에 각각 나타내었다.

이의 결과, 0.5 mM 과산화수소를 효모에 처리하여 세포로부터 세포질에 존재하는 단백질을 추출한 다음 무변성-전기영동법(native-PAGE)를 수행하였다. 이의 결과, 과산화수소를 처리하지 않은 정상 효모와 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 본래구조의 단백질을 발현시킨 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II (Δ cPrxI/II)로부터 얻어진 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)단백질은 적은양의 고분자(HMW) 복합체와 함께 올리고머와 작은 구조의 다양한 형태를 이루고 있음을 알 수 있었다(도 5B, WT-a 참조).

이런 세포들은 0.5 mM 과산화수소에 10분 동안 노출되었을 때, 약간의 중간 크기의 올리고머 단백질은 반응을 보이지 않았지만, 대부분의 저분자 (LMW) 단백질은 과산화수소 농도에 의존적으로 고분자 복합체로 전환되는것을 알 수 있었다(도 5-B, WT-b 참조). 그러나, 고분자 복합체는 과산화수소를 제거한 후 20분 내에 원래의 구조로 되돌아가는 데(도 5-B, WT-c 참조), 특히, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)은 티오레독신 (thioredoxin)이 없는 돌연변이 효모에서는 과산화수소에 의한 어떤 구조적 변화도 일어나지 않았다(도 5B, Δ trx1/2 참조). 이는 티오레독신이 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 고분자 (HMW) 복합체를 형성하는데 중요하다는 것을 보여주는 것이다.

또한, 과산화수소에 노출된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 시스-티올들이 시스-설피드닉산으로 과산화되고 그 과산화된 단백질이 설피레독신 (srx1) 에 의해서 환원되어진다는 보고 (Biteau et al., Nature, 425: 980-984, 2003)를 고려해서, 과산화수소의 처리에 대한 2-시스테인 페록시레독신 I의 산화상태와 그것의 구조적 변화에 있어서 설피레독신 (srx1)의 역할을 분석한 결과, 설피레독신 유전자가 제거된 변이균주 (Δ srx1 세포) 에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)단백질은 과산화수소에 의해 고분자 복합체를 형성하지만, 과산화수소를 제거하더라도 원래의 구조로 되돌아가지 않았다(도 5B, 설피레독신 유전자가 제거된 변이균주 (Δ srx1 세포). 이는 2-시스테인 페록시레독신 I 구조의 회복에는 설피레독신 (srx1)이 중요하다는 것을 보여주는 것이다. 2-시스테인 페록시레독신 I의 산화상태를 2D-겔 면역 블롯 (immunoblot)으로 분석하였을때, 대부분의 2-시스테인 페록시레독신 I 은, 야생형 효모에서는 환원된 형태로 존재했으나, 과산화수소를 처리하면 산화된 형태의 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 양이 크게 증가함을 알 수 있었다(도 5C, WT 참조). 그리고 과산화수소를 제거하면, 환원된 형태의 비율은 산화된 효소의 감소와 일치하여 증가되었다. 그러나, 설피레독신 유전자가 제거된 변이균주 (Δ srx1 세포)에서 과산화수소의 제거는 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 산화 형태를 감소시키지 못했다(도 5C; 설피레독신 유전자가 제거된 변이균주, Δ srx1 세포). 이런 결과는 티오레독신, 설피레독신과 2-시스테인 페록시레독신 I의 산화환원 관계가 2-시스테인 페록시레독신 I단백질 구조와 기능의 전환 과정에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 나타내는 것이다.

또한, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)본래구조의 (native)단백질과는 달리, C47S-, 혹은 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현시킨 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 세포에 과산화수소를 처리하여 분리한 C47S가 결여된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)단백질은 작은 올리고머 구조를 형성하였고, 그것들은 과산화수소에 전혀 반응하지 않는 것을 알 수 있었다(도5D, 2-시스테인 페록시레독신 I^{C47S}). 이것은 퍼록시다제 활성자리인 Cys⁴⁷이 생체 내에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 과산화수소에 의한 고분자 복합체 형성에 필수적이라는 것을 의미한다. 그러나, C170S-2-시스

테인 페록시레독신 I을 발현시킨 $\Delta 2$ -시스테인 페록시레독신 I/II 세포로부터 추출된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI) 단백질은 저분자와 올리고머 단백질들, 심지어 과산화수소를 처리하기 전에 형성되어있던 많은 양의 고분자 복합체를 함께 포함하고 있었다(도 5D, 2-시스테인 페록시레독신 I^{C170S}).

이는 도 5C에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 시스테인 산화에 대한 결과를 고려했을 때, Cys¹⁷⁰이 존재하지 않을 경우에는 C170S-2-시스테인 페록시레독신 I의 Cys⁴⁷ 잔기가 정상적인 환경에서 자란 효모에서 산화적 스트레스에 너무 민감하여 과산화되고 이것은 생체내에서 고분자 (HMW) 복합체의 형성을 유도하는 것으로 생각된다. C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I의 생체 외에서 상당한 사페론 활성을 나타내는 것(도 4E 참조)과 더불어 이런 결과는 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 저분자 (LMW) 단백질이 두 가지의 다른 경로에 의해서 다중 결합을 하는 것을 보여준다. 즉, 한 가지 경로는 과산화수소에 민감하고 다른 한 가지는 그렇지 않은 경로를 가지는 데, 과산화수소에 민감한 반응에서는, 퍼록시다제의 활성부위 Cys⁴⁷이 고분자 (HMW) 복합체 형성 과정에 중요하게 관여하고, 반면에 후자의 경우에는 저분자 (LMW)에서 고분자(HMW) 단백질을 형성하는데 Cys⁴⁷이 필요하지 않는 것을 의미한다.

그리고, 호기성 조건에서 자란 효모 세포는 2-시스테인 페록시레독신 I의 주된 구조로서 작은것과 올리고머 단백질을 포함하고 있었으나 과호기성(95% O₂/5% CO₂) 환경으로 배양조건이 바뀌어 졌을 때는 그런 단백질의 대부분이 고분자 (HMW) 복합체로 중합되는 것을 확인하였다(도 5E 참조). 그러면서 과산화수소의 효과와 마찬가지로, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 고분자 (HMW) 복합체는 산소 압이 제거되어진 후에는 원래의 구조로 되돌아간다. 이의 결과는 생체 내에서 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 과산화수소에 의한 고분자 (HMW) 복합체 형성은 1mM 과산화수소를 처리한 WT 효모로부터 순수분리한 단백질의 전자현미경 (EM) 분석에 의해서도 확인되어졌다(도 5F 참조).

또한, 열충격이 산화적 스트레스의 한 형태 (Davidson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 5116-5121, 1996)라는 많은 증거들이 제시되었기 때문에, 생체내에서 2-시스테인 페록시레독신 I의 구조적 변화에서 온도의 영향을 분석한 결과, 43°C에서 10분동안 배양한 효모 세포는 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 구조적 변화를 야기하지 않은 반면, 46°C에서 10분 동안의 열충격으로 저분자에서 고분자복합체로 현저한 구조적 변화가 유도되었다(도 5G 참조). 이는 산화적 스트레스의 효과와 같이 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 구조적이고 기능적인 조절은 세포에 노출된 열충격의 정도에 의해 생체내에서 민감하게 조절되는 것이다. 특히, 2-시스테인 페록시레독신 I의 구조적 변화를 유도하지 못하는 적은 양의 과산화수소(50μM)의 첨가로 2-시스테인 페록시레독신 I의 구조가 10분 내에 저분자에서 고분자 복합체로 크게 이동됨을 발견하였다. 그리고, 생체내에서 열충격과 산화적 스트레스의 관계를 연구하기위해 우리는 열충격에 의해 생성되어지는 활성산소종(ROS)의 세포내 양을 DCF염색과 공초점 형광현미경으로 측정한 결과, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 구조적인 변화가 열충격에 의해 생성된 ROS의 양과 아주 밀접함을 알 수 있었다(도 5H 참조). 이의 사실은 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 단백질 구조와 기능이 세포에서 주로 ROS의 생성정도에 의해 조절되어진다는 것을 의미한다.

[실시예 6] 2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 효모의 열 충격에 대한 저항성

2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 열 충격이나 산화적 스트레스에 매개되는 퍼록시다제 기능에서 사페론으로의 구조적이고 기능적인 전환의 생리적인 특성을 이해해야한다. 특히, 세포 생존율의 손실이나 세포질 구성물의 손상을 일으키지 않는 0.5mM 과산화수소보다 낮은 농도에서도 나타나는 2-시스테인 페록시레독신 I의 과산화수소 의존적 조절은 매우 흥미롭다.

또한, 본 발명에서는 2-시스테인 페록시레독신 I의 퍼록시다제 기능이 다양한 세포의 방어체계에서 이미 검증되었기 때문에 2-시스테인 페록시레독신 I이 작용하는 사페론의 역할에 중점을 두었다 (Wong et al., J. Biol. Chem., 277: 5385-5394, 2002).

이를 위해, 도 6에 나타난 바와 같이, 야생형 효모의 열충격 저항성(1), pRS416 vector로 형질전환된 $\Delta 2$ -시스테인 페록시레독신 I/II 세포(2), 각각의 프로모터 하에서 native(3)-, C47S(4)-, C170S(5)-, 그리고 C47/170S(6)-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 동질유전자 돌연변이체의 균주를 YPD배지에서 1밀리리터당 5×10^7 (개/ml) 까지 배양하고, 과산화수소 (0.2mM) 가 없는 상태(A)와 있는 상태(B)에서 30°C에서 10분간 기하급수적인 단계 (logarithmic phase)의 중간까지 전배양하고, 각 균주로부터 얻은 분획을 30°C 혹은 43°C의 시험관에 옮겨서 세포 생존율을 측정하였다. 그리고, 세포 생존율은 30°C에서 배양한 세포수와 비교하여 43°C에서 배양한 생존 세포수를 백분율로 나타냈다. 그리고, 각 돌연변이체(1~6)에서 얻은 총 추출물을 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하였다.

그리고, 0.2mM 과산화수소를 10분동안 전처리한 후에 열충격을 준 효모 균주에서 단백질의 침전을 방지하는 2-시스테인 페록시레독신 I의 능력을 측정하기 위하여, 침전물 탐지의 민감도를 크게 향상시킨 Tomoyasu et al.(2001)의 변형방법을 적용하여, 43℃에서 20분 처리한 효모 균주로부터 배양분획을 세포용해와 원심분리를 통해 불용성 단백질을 분리하고 SDS 첨가 변성 전기영동을(SDS-PAGE)을 한 후 은염색법(silver staining)을 수행하여 가시화 하였다(도 6-C).

상기한 방법을 수행한 결과, Cys-돌연변이 2-시스테인 페록시레독신 I 유전자 구조물(constructs)이 형질전환된 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 효모는 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 세포를 제외하고는 WT 효모에서 발현된 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)과 비슷한 수준에 상응하는 단백질이 발현되었다(도 6A, 전기영동 참조). 그리고, 효모 균주를 이용하여 열충격에 유도되는 세포 생존율의 손실결과, 효모 세포가 43℃에서 30분동안 노출되면, Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 세포와 C47S- 또는 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 동질유전체계통은 각각 12%와 48% 생존하였다. 이와 반대로 WT 효모와 본래구조의 단백질 또는 C170S-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 균주는 약 62-73%의 생존율을 나타내었다. 이와같이 돌연변이 효모의 거의 2배의 열 저항성 증가는 2-시스테인 페록시레독신 I의 샤페론 기능에 의한 것임을 나타내고 있다(도 6 A 참조).

또한, 0.2mM 과산화수소를 10분동안 전처리를 한 효모의 열 충격에 대한 저항성을 생존율로 측정한 결과, 0.2mM 과산화수소로 전배양한 효모는 WT이나 본래구조의 (native)단백질-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 세포에 저항성을 더 높게 만들고 있음을 확인할 수 있었다(도 6B 참조). 그러나, 생체내에서 2-시스테인 페록시레독신 I의 구조적이고 기능적인 전환에 필수적인 아미노산인 Cys47이 결여된 C47S- 또는 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I은 저항성을 증가시킬수 없었다. 이는 본래구조의 (native)단백질-2-시스테인 페록시레독신 I과 C47이 결여된 2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 효모의 세포 생존율의 차이는 그들의 샤페론 활성 차이 때문이라고 판단된다.

그리고, 도 6A-B에 나타난 바와 같이, 효모에서 2-시스테인 페록시레독신 I의 Cys47에 매개되고 과산화수소에 민감한 샤페론 활성은 Cys47이 결여된 2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 효모보다 훨씬 강함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 낮은 수준의 과산화수소는 2-시스테인 페록시레독신 I의 퍼록시다제로부터 샤페론으로의 기능적인 전환을 유도하고 높은 수준의 다른 스트레스의 독성을 중화하는 적응 반응을 유도한다는 것을 제시하고 있다 (Dempsey et al., Cell, 67: 837-839, 1991).

또한, 세포 생존율의 손실이 세포내에서 열에 불안정한 단백질들의 침전과 관련있다는 보고에 기초하여(Tomoyasu et al., Mol. Microbiol., 40: 397-413, 2001), 과산화수소를 10분동안 전처리한 후에 열충격을 준 효모 균주에서 단백질의 침전을 방지하는 2-시스테인 페록시레독신 I의 능력을 분석한 결과, 30℃에서 0.2mM 과산화수소로 10분 전처리한 효모균주에서는 단지 몇종류의 침전된 단백질 밴드가 보였다(도 6C 참조). 반면에, Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 균주와 C47S- 또는 C47/170S-2-시스테인 페록시레독신 I을 발현하는 동질유전체 돌연변이 효모에서는 아주 많은 양의 단백질이 열충격 20분 이내에 변성되어 침전되었다. 그러나 Δ 2-시스테인 페록시레독신 I/II 균주에 본래구조의 단백질이나 C170S-2-시스테인 페록시레독신 I의 발현으로 스트레스에 의해 유도되는 단백질의 침전을 크게 방지하였다. 이러한 결과들은 열충격으로부터 효모를 보호하는 것은 퍼록시다제가 아니라 산화적 스트레스에 의해 크게 증가되어지는 2-시스테인 페록시레독신 I의 샤페론 때문이라는 것을 입증하고 있는 것이다.

[실시에 7] 애기장대 (arabidopsis)의 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1) 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 내병, 내재해성 특성분석

애기장대의 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1) 유전자를 도입하기 위한 식물체 전이용 벡터를 제조하기 위하여, 먼저 애기장대로부터 전체 RNA를 분리하여 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그리고, 합성된 cDNA와 식물 2-시스테인 페록시레독신 I (NM_111995)에 특이적 프라이머를 넣고 연쇄중합반응을 하여 식물의 2-시스테인 페록시레독신을 클로닝하였다. 이때 특이적 프라이머에는 pBI121 벡터에 삽입을 이용하기위해 XbaI과 SacI의 효소부위를 첨가하였다. 그리고, 클로닝 한 2-시스테인 페록시레독신을 콜리 플라워 모자이크 바이러스(CaM virus)의 35S 프로모터(promoter)와 2'/7'전사 종결자의 조절 하에서 발현될 수 있게 pBI121 벡터에 삽입하여 재조합 식물체 전이용 벡터인 pBI121::Prx를 제조하였다(도 7의 A). 이때, 제대로 된 서열을 가지는지의 여부를 확인하고자 염기서열분석을 통하여, 클로닝한 2-시스테인 페록시레독신의 염기서열이 NCBI에 등재된 NM_111995 염기서열과 같음을 확인하였다.

이때, 도 7-A에서 kan은 카나마이신으로 형질전환 후 형질전환 식물체를 선별하기 위한 항생제 마커(marker), RB는 우측보드(right board), LB는 좌측보드 (left board), Prx는 애기장대의 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1)의 펩타이드 유전자, 및 2'/7'는 아그로박테리움 투머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 유전자중 2'/7' 유전자의 비해독 유전자 염기서열을 나타낸다.

그리고, 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔스(agrobacterium tumefaciens)GV3101 박테리아 세포에 전기충격법으로 형질 전환하여 형질전환체를 선발하였다.

형질전환체의 선발방법은 먼저 전기충격을 가한 세포를 카나마이신,리팜피신, 젠타마이신이 든 배지에 깔고 30℃에서 배양하였다(리팜피신과 젠타마이신은 아그로박테리아의 항생제마커이며, 카나마이신은 pBI121벡터의 항생제 마커이다). 그리고, YEP배지에서 자란 콜로니를 따서 아그로박테리아의 DNA분리하고 연쇄중합반응(PCR)을 통해서 형질전환을 확인하였다.

그런다음, 애기장대를 3주 정도 키운후 첫 번째 꽃대를 잘라 다른 꽃대가 올라온 상태로 만들고, 애기장대를 형질전환 세포가 든 용액에다가 담구는 디핑 형질전환법을 사용하여 형질전환된 애기장대를 만들고 씨를 받았다.

그리고, 획득된 씨에서 형질전환된 애기장대를 선별을 하기위해, 2번의 선별과정을 거치게 하였다. 첫 번째 선별과정에서는 pBI121벡터의 항생제마커인 카나마이신과 아그로박테리아가 자라지 못하게하는 세포탁심이 든 배지에 애기장대의 씨를 뿌려, 성장하는 3종류의 애기장대를 선별하고, 선별된 애기장대로를 키워 씨를 받았고(세대1), 두 번째 선별과정에서 카나마이신만 든 배지를 이용하여 3종류의 애기장대씨를 뿌리고 1종류당 4개씩 애기장대를 선발(세대2)하고 이들 애기장대가 과발현되었는지를 확인하기 위해서 애기장대 잎으로부터 단백질을 얻었다. 얻은 단백질은 SDS전기영동을 한후에 웨스턴블랏을 하여 과발현을 확인하였다.

이의 결과, 도 7- B에 나타난 바와 같이 3번 라인에서 가장 많은 양의 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1)이 발현됨을 확인하였고, 3번 라인의 형질전환된 애기장대를 스트레스 저항성을 위한 실험에 이용하였다.

그리고, 2-시스테인 페록시레독신 I (bas1) 형질전환 식물체의 스트레스 저항성을 관찰하기 위하여, 45℃에서 6시간 열처리한 시료와 병원균(슈도모나스 시린개: pseudomonas syringe)을 처리한 결과 와일드타입(wild type)에 비해 상기 3번 라인의 형질전환체(transgenic plant)이 열 충격 및 병원균에 대해서 강력한 저항성을 가지고 있음을 알 수 있었다(도 7-C 참조).

[실시에 8] 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체(High molecular weight complex)에 특이하게(specific) 반응하는 모노클로날 항체(monoclonal antibody)를 이용한 인간의 암세포 진단

항체제조를 위해, 먼저 전장(full length)의 페록시레독신 I DNA을 얻기위해 인간 태반(human placenta) cDNA 라이브러리(library)로부터 BamHI과 XhoI자리로 프라이머를 작성하여 PCR(94℃, 7분, 변성/94℃, 30초 - 63℃, 30초, 30회 증폭/72℃ 1분 프라이머 연장)을 수행하였다. 증폭된 PCR산물(약 600bp)을 아가로스 겔로부터 회수하여 GST가 퓨전된 pGEX 벡터에 크로닝 하였다. Prx1 단백질을 대량생산 하기위해 대장균에 도입해 과 발현 시킨 후 GST에 퓨전된 단백질을 얻을 수 있었다. 프로테이즈를 이용하여 퓨전된 GST를 제거한 후 순수한 HPrx1단백질을 얻을수 있었고, 이를 SDS 전기영동에서 확인할 수 있었다.

그리고, 상기 분리한 단백질을 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의하여 분자량의 크기에 따라 분리한 후, 저분자량의 단백질과 고분자 결합체 (High molecular weight complex)을 따로 분획하여 각각에 대한 모노클로날 항체 (monoclonal antibody)를 제조하는 데 사용하였다(Harlow,E. and Lane D. Antibodies-A laboratory Manual Cold Spring Harbour Laboratory, 1998; Mishell B.B and Shiigi S.M. Selected Methods in Cellular Immunonogy W.H. Freeman and Company, 1980).

즉, 상기 획득된 고분자 복합체 인간 페록시레독신 I (HPrx1)은 항체를 얻기 위해 쥐에 2주 간격으로 5회 주사하였다. 주사액은 1회 주사시 500μg의 단백질을 동일 부피의 어쥬반트(adjuvant)를 골고루 섞어 주사하고, 마지막 주사한 후 1주뒤 쥐의 비장으로부터 B-세포를 추출하고, 이를 SP2 myeloma cell에 융합시켰다. 그리고, 이를 HAT 배지에서 배양해 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 통한 선발작업을 하였다. 코팅 완충용액(coating buffer; carbonate-bicarbonate)를 96well plate에 저온(4℃)에서 24시간 이상 두어 코팅시킨 후, 낮은 농도의 염 완충용액(salt buffer)으로 씻어내고 3% 스킵 밀크(skim milk)를 실온에서 1시간 이상 두어 블라킹시킨다. 다시 낮은 농도의 염 완충용액으로 씻어내

고, 항원으로 사용한 고분자 복합체를 1시간 동안 반응시킨다. 이를 낮은 농도의 염 완충용액으로 세척하고, 하이브리도마 세포(hybridoma cell)의 상층액을 1시간 동안 반응시킨 후 높은 농도의 salt 버퍼로 세척하고, 2차 항체(donkey anti mouse IgG-HRP)를 처리한다. 이를 실온에서 1시간 반응시킨 후 높은 농도의 salt 버퍼로 세척하고 발색시약을 처리해 실온에서 10분간 반응시킨 후 반응 정지 용액을 처리하고 ELISA 분석기로 분석한다. 이 분석을 통해 양성반응을 나타낸 단일클론 항체만을 대량생산 하게 되고 이는 웨스턴 블랏을 통해 고분자 복합체만을 특이적으로 인식함을 확인 하게 되었다.

그리고, 제조한 인간의 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체(High molecular weight complex)를 특이하게 인지하는 모노클로날 항체의 특이성을 관찰하기 위하여 인간의 조직에서 추출한 단백질을 10% 무변성-전기영동법(native-PAGE)으로 분리한 후 분리된 단백질과 항체를 반응시킨 결과, 도 8-A와 같이 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체(High molecular weight complex)와 특이적으로(specific) 인지하는 것을 확인하였다(도 8-A 2번 라인참조).

이때, 도 8-A의 1번 라인은 무변성-전기영동법으로 전기영동 한 후 은염색액을 이용하여 가시된 것을 나타낸 사진이다.

이로부터, 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체(High molecular weight complex) 단백질에 의하여 제조된 모노클로날 항체는 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체(High molecular weight complex) 단백질과만 결합하는 특이성이 있다는 사실을 알 수 있었다.

이러한 결과로부터 본 발명에서는 고분자 결합체(High molecular weight complex)와 특이적으로 인지하는 모노클로날 항체를 이용하여 여러 가지 암에 걸린 환자의 조직으로부터 얻어낸 시료로부터 전기영동으로 단백질을 분리하고, 이로부터 웨스턴 블롯팅을 수행하여 인간로부터 추출된 시료로부터 암의 진단 가능성을 확인하고자 하였다.

이에, 간암, 자궁암, 유방암, 폐암에 걸린 환자의 조직으로부터 적출하여 추출한 세포에서 분리한 단백질을 무변성-전기영동법으로 전기영동을 한 후, 2-시스테인 페록시레독신의 고분자량 단백질을 주사하여 제조한 모노클로날 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 하였다.

이의 결과, 정상인과 달리 고분자량 복합체의 2-시스테인 페록시레독신 I이 육안으로 관찰이 될 정도로 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다(도 8-B 참조).

따라서, 2-시스테인 페록시레독신 I의 고분자 결합체 (High molecular weight complex)를 인지하는 모노클로날 항체를 사용할 경우, 인간의 다양한 암에 걸린 상태의 진단이 가능하리라고 추측되며, 이러한 성질을 이용한 진단 키트(kit)의 제조와 간단한 진단방법의 개발 등을 하게 될 경우, 다양한 질병의 진단시약 개발에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

[실시예 9] 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 퍼옥시다제와 사페론 활성의 산화적 스트레스-의존성 구조적 전환과 기능적 전환에 대한 생리적인 특성 메카니즘

도 9에 나타난 바와 같이, 두 개의 독립적인 경로에 의해 생성되는 두 부류의 2-시스테인 페록시레독신 I 단백질에서는 과산화수소에 대해 감수성이 있는 경로와 과산화수소에 대한 감수성이 없는 경로가 독립적으로 구분되어진다. 한 부류의 2-시스테인 페록시레독신 I는 이량체, 사량체, 다량체가 있고, 이것들은 정상적 상태에서 존재하는 형태이다. 이런 형태는 2-시스테인 페록시레독신 I의 47번째 시스테인 잔기가 결합에 참여하지 않은 채 형성된다. 다른 부류의 2-시스테인 페록시레독신 I은 고분자 복합체를 포함하는데, 이것은 산화적 충격이 있을 때에만 47번째 시스테인 잔기에 의해 매개되는 다량체화 과정을 통해 생체내에서 형성된다.

그리고, 티오레독신(Trx), 티오레독신 리덕타제(TR), 그리고 NADPH를 포함하는 Trx 시스템 존재 하에서는 2-시스테인 페록시레독신 I이 고분자 복합체를 형성하는 데 필수적인 반면, 에스알엑스 1(srx1)은 저분자 단백질을 분해하는 데 필수적이다.

또한, 저분자 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)의 주요한 기능은 과산화수소를 분해하는 티오레독신(Trx) 의존성 퍼옥시다제이지만, 고분자 단백질은 외부충격으로부터 단백질 기질의 변성을 효과적으로 막는 슈퍼-사페론으로서의 기능을 한다.

따라서, 2-시스테인 페록시레독신 I의 두 가지 기능은 생체 내에서 산화적 스트레스에 의해 가역적으로 전환되며, 저분자 단백질에서 고분자 단백질로의 구조변화를 수반하는 메카니즘을 갖게 된다.

이러한 메카니즘에서, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI)의 47번째 시스테인 잔기는 효모 세포에서 매우 효과적인 ‘과산화수소 감지자(sensor)’의 역할을 한다.

[실시예 10] 효모 2-시스테인 페록시레독신 1의 대량 생산

미생물 (효모)에서 2-Cys Prx를 클로닝하기 위해, 효모 게놈(genomic) DNA로부터 BamHI과 XhoI의 제한효소를 포함하는 프라이머 (PCR primer)로 PCR하여 분리한 DNA를 GST가 퓨전된 pGEX 벡터에 도입하여 염기서열 분석으로 페록시레독신임을 확인하였다. 그리고, pGEX::cPrxI을 대장균에 형질전환하여 50 μ g/ml ampicilin (pGEX벡터의 항생제 marker) 이 함유된 LB 배지에 37 $^{\circ}$ C, 12 시간 배양한 후 형질전환된 군집(colony)를 선별하였다. 이로부터 페록시레독신 단백질을 얻기 위해 cPrxI이 형질전환된 대장균으로부터 페록시레독신을 과발현시켜 친화성 크로마토그래피로 GST가 퓨전된 페록시레독신 단백질을 분리할 수 있다. 그리고 트롬빈 (thrombin)을 이용하여 퓨전된 GST를 제거하여 순수한 페록시레독신 단백질을 얻었고, 이를 SDS 전기영동으로 확인하였다. 그리고, 순수한 페록시레독신을 과발현하는 상기 대장균 (*E.coli*/pGEX-cPrxI)를 2004년 5월 24일 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 수탁번호 KCTC 10645BP를 부여받았다.

[실시예 11] 인간 2-시스테인 페록시레독신 2의 대량생산

인간 세포에서 2-시스테인 페록시레독신 2를 클로닝하기 위해, 인간 게놈 DNA로부터 BamHI과 XhoI의 제한효소를 포함하는 프라이머 (PCR primer)로 PCR하여 분리한 DNA를 GST가 퓨전된 pGEX 벡터에 도입하여 염기서열 분석으로 페록시레독신임을 확인하였다. 그리고, pGEX::hPrx II을 대장균에 형질전환하여 50 μ g/ml ampicilin (pGEX벡터의 항생제 marker) 이 함유된 LB 배지에 37 $^{\circ}$ C, 12 시간 배양한 후 형질전환된 군집 (colony)를 선별하였다. 이로부터 페록시레독신 단백질을 얻기 위해 hPrx II 이 형질전환된 대장균으로부터 페록시레독신을 과발현시켜 친화성 크로마토그래피로 GST가 퓨전된 페록시레독신 단백질을 분리할 수 있다. 그리고 트롬빈 (thrombin)을 이용하여 퓨전된 GST를 제거하여 순수한 페록시레독신 단백질을 얻었고, 이를 SDS 전기영동으로 확인하였다. 그리고, 순수한 페록시레독신을 과발현하는 상기 대장균 (*E.coli*/pGEX-hPrx II)를 2005년 4월 25일 생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 수탁번호 KCTC 10793BP를 부여받았다.

[실시예 12] 인간 페록시레독신 II의 샤페론 기능

이전에 보고된 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I과 II가 퍼옥시다제와 샤페론의 두 가지 기능을(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004) 가진다고 알려졌고, 놀랍게도 인간 페록시레독신이 효모의 페록시레독신 I 과 II (cPrx I, II) 같이 비슷한 생화학적인 특징(Wood et al., Science, 300: 650-653, 2003)과 높은 아미노산 유사성을 가진다. 그래서 인간 페록시레독신 II가 시트레이트 신타아제(CS)의 열에 의한 응집을 저해하는 활성을 확인 함으로써, 샤페론의 잠재적 활성을 확인하고자 하였다.

이때, 도 10은 도 10은 열 충격 스트레스에 대한 본래구조의 인간 2-시스테인 페록시레독신 II의 샤페론 활성을 나타낸 도면으로, (A)의 흰색 동그라미는 1 μ M의 시트레이트 신타아제(CS)만 포함된 혼합물, 검은색 동그라미는 1 μ M의 BSA, 검은색 사각형은 2 μ M의 인간 페록시레독신 II(hPrx II), 검은색 삼각형은 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)가 포함된 혼합물을 나타내고, (B-C)의 흰색 동그라미는 1 μ M의 시트레이트 신타아제(CS) 혹은 인슐린만 포함된 혼합물을 나타낸다, 그리고 검은색 사각형, 검은색 동그라미, 검은색 삼각형은 인간 페록시레독신과 시트레이트 신타아제(CS)나 인슐린과의 분자 비율이 각각 1:1, 2:1, 3:1 일때를 나타낸다. (D) 1라인은 알파-시뉴클레인(α -synuclein)만 존재할 때, 2라인은 알파-시뉴클레인(α -synuclein)을 10 μ M 구리,아연-슈퍼옥사이드 디스무타제(Cu, Zn-SOD)와 300 μ M 과산화수소와 함께 반응시킨 것이고, 3라인은 2라인의 반응에 10 μ M의 인간 페록시레독신 II 단백질을 함께 넣어서 반응시킨 것이다.

인간 페록시레독신 II(hPrx II)는 대조군으로 사용한 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I(cPrxI)과 비슷하게 43 $^{\circ}$ C에서 시트레이트 신타아제 (CS)의 열에 의한 응집을 효과적으로 저해했다(도 10A 참조). 인간 페록시레독신 II(hPrx II)와는 대조적으로 소혈장 단백질(BSA)은 시트레이트 신타아제 (CS)의응집을 억제하지 못했다. 인간 페록시레독신 II를 농도별로 시트레이트 신타아제와 혼합할 때 농도 의존적으로 시트레이트 신타아제의 응집이 줄어들었고, 인간 페록시레독신 II와 시트레이트 신타아제의 분자 비율이 3:1일때에는 시트레이트 신타아제의 응집이 완전히 억제되었다(도 10B 참조). 그러므로 인간 페록시레독신 II가 효과적인 분자 샤페론으로 기능하다는 것을 추측할 수 있었다. 시트레이트 신타아제 외에, DTT에 의해 유도되는 인슐린의 베타 사슬의 침전을 인간 페록시레독신 II가 보호하는지를 알아보았다(도 10C 참조). 위에서의 사용한 모델 기질 이외에, 파킨슨 병과 알츠하이머 병에 걸린 사람의 뇌에 존재하는 로우체체(Lewy bodies)의 주요 구성물질이며 산화 스트레스에 의해 비정상적으로 응집되는 알파-시뉴클레인(α -synuclein)에(Kim et al., Free

Radic. Biol. Med., 32: 544-550, 2002, Matsuzaki et al., Brain Research, 1004: 83-89, 2004) 대한 인간 페록시레독신 II의 사페론 활성을 확인했다. 이뮤노블롯(immunoblot) 분석은 이전에 알려진 것과 같이 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)와 과산화수소에 의해 생성된 활성산소종(ROS)에 의해 알파-시뉴클레인(α -synuclein)이 응집된다는 것을 확인 했다(Kim et al., Free Radic. Biol. Med., 32: 544-550, 2002). 하지만 활성산소종(ROS)에 의해 유발되는 알파-시뉴클레인(α -synuclein)의 변성과 응집은 인간 페록시레독신 II(hPrx II)에 의해 방지되었다(도 10D 참조). 이것으로 인간 페록시레독신 II(hPrx II)의 사페론 기능이 포유동물 세포의 세포질에 존재하는 단백질의 활성산소종에 의한 응집을 방지하는데 효과적이라는 것을 추측 할 수 있다. 위와 같은 결과로부터 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I과 II(cPrx I, II)에서 알려진 것과 같이 인간 페록시레독신 II(hPrx II) 역시 잘 알려진 퍼록시다제 기능뿐 아니라 활성이 좋은 분자 사페론의 기능을 가진다는 것을 알 수 있다(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004).

[실시예 13] 인간 페록시레독신 II(hPrx II)의 두가지 기능은 단백질의 구조와의 연관성

이전에 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I과 II(cPrx I, II)가 다양한 크기의 복합체를 형성하고 이런 구조에서의 크기변화가 퍼록시다제와 사페론의 두 가지 기능과 밀접한 관계가 있다는 것을 밝혔다(Janget al., Cell, 117: 625-635, 2004). 인간 페록시레독신 II(hPrx II)가 강한 사페론 활성을 가지고 고분자량의 복합체를 이루는 것이 분자 사페론의 전형적인 특징이기 때문에(Haley et al., J. Mol. Biol., 277: 27-35, 1998) 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(SEC)에 의해 인간 페록시레독신 II(hPrx II)의 분자구조를 분석하였다.

이때, 도 11은 단백질을 분자량 크기별로 분리하는 분리 크로마토그래피를 이용해 인간 페록시레독신 II의 구조와 두가지 기능, 퍼록시다제와 사페론 기능의 관계를 나타낸 도면으로, (A)는 크로마토그래피의 결과내에 나타난 숫자는 예상되는 단백질의 분자량을 나타낸 것이고 이 후의 실험을 위해서 전체 단백질(Tot)을 크기 별로 세 구간의 분획(F-H:큰것, F-M:중간것, F-L:작은것)으로 나누어서 나타내었다.

이 분석에서 인간 페록시레독신 II는 100kDa에서 1,000kDa 이상의 분자량을 가지는 다양한 형태의 고분자량 단백질 복합체를 가지고 있다는 것을 확인했다(도 11A 참조). 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피(SEC)에 의해 분리된 각각의 분획을 무변성 전기영동법(native-PAGE)을 실시하고 인간 페록시레독신 II의 항체를 이용하여 웨스턴 블롯(western blot)으로 분자의 크기를 확인한 결과 각각의 분획에서 다양한 형태의 단백질 복합체가 확인 되었다(도 11B 위쪽 패널 참조). 무변성 전기영동법(native-PAGE)에 의한 인간 페록시레독신 II의 단백질 크기는 SEC에서 나타난 것과 비슷한 결과를 얻었다. 그러나 무변성 전기영동법에서와는 달리 SDS 첨가 변성 전기영동법(SDS-PAGE)에서는 SEC에서 분리된 모든 분획에서 단지 22kDa의 한가지 크기만 존재했다. 이것은 자연적인 조건에서 인간 페록시레독신 II가 다양한 수로 이루어진 동일다량 복합체(homo-polymeric complex)들로 존재함을 보여준다. 이전에 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I과 II(cPrx I, II)가 가지는 두 가지 기능이 구조에 의해 조절된다는 것을 밝혔기 때문에(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004) 인간의 페록시레독신 II도 같은 경향성을 가지는지 알아보았다(도 11C 참조). SEC에 의해 분리된 각각의 분획에 존재하는 분자구조는 시험관내(in vitro)에서 그들의 생화학적 성질을 분석하기에 충분할 정도로 안정하다(결과 보이지 않음). 가장 큰 크기의 분자량을 가지는 인간 페록시레독신 II의 단백질 복합체 (F-H)는 뛰어난 사페론 활성을 나타내고 퍼록시다제 활성은 거의 가지지 않았다. 반면에 가장 작은 크기의 분자량(F-L)을 가지는 단백질들은 사페론 활성은 가지지 않고 현저한 퍼록시다제 활성만을 가졌다. 비교적으로, 중간 크기의 단백질 복합체(F-M)는 전체 단백질(Tot)에서 나타난 것과 같이 퍼록시다제 활성과 사페론 활성 두 가지를 모두 나타내었다. 위의 관찰들은 인간 페록시레독신 II의 퍼록시다제와 사페론 활성이 이 단백질의 구조에서 동일 다량체화(homo-polymerization)의 정도에 의해 조절된다는 것을 예상 할 수 있었다.

[실시예 14] 과산화수소에 반응하는 인간 페록시레독신 II 단백질의 구조와 기능에 있어서 이 단백질의 아미노 말단(N-terminal)에 존재하며 퍼록시다제 활성을 나타내는 시스테인(Cys)과 카르복시 말단(C-terminal) 영역의 영향.

과산화수소의 촉매 과정에서 2-시스테인 페록시레독신의 퍼록시다제 활성을 가지는 시스테인은 설페닉 산(Cys-SOH)으로 산화되고 인접한 티올(thiol)과 반응하여 두 분자간의 이황화 결합(disulfide bond)을 형성한다(Chae et al., J. Biol. Chem., 269: 27670-27678, 1994). 하지만 증가된 과산화수소의 량에 효모가 노출될 경우, 그 퍼록시다제 활성을 가지는 시스테인은 설페닉(sulfinic) 혹은 설포닉(sulfonic) 산으로 과산화된다(Woo et al., Science, 300: 653-656, 2003, Yang et al., J. Biol. Chem., 277: 38029-38036, 2002). 이 반응은 효모의 2-시스테인 페록시레독신의 구조적 변화를 유발하고 퍼록시다제에서 분자 사페론으로의 기능적 전환을 중개한다(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004). 2-시스테인 페록시레독신의 기능 조절은 또한 인산화와 제한된 단백질 분해에 의해 조절된다(Chang et al., J. Biol. Chem., 277: 25370-25376, 2002, Koo et al., Arch. Biochem. Biophys., 397: 312-318, 2002). 최근에 시스터소마 만소니(Schistosoma mansoni)에서 두 개의 2-시스테인 페록시레독신이 분리되었는데, 이중 하나는 과산화 수소에 의한 과산화

에 민감하고 다른 하나는 과산화에 현저한 저항성을 나타내었다(Sayed et al., J. Biol. Chem., 279: 26159-26166, 2004). 그 실험에서 저자들은 산화에 의한 비활성화에서 페록시레독신의 민감성은 카르복시 말단(C-terminal)에 존재하는 YF-모티프(motif)의 존재 때문이라고 결론을 내렸다.

도 12는 인간 페록시레독신 II의 구조와 기능에 있어서 아미노 말단의 퍼록시다제 활성을 나타내는 51번 시스테인과 카르복시 터미널이 미치는 영향을 나타낸 도면으로, (A)는 본래모습의 인간 페록시레독신 II(Native)와 세 종류의 돌연변이 인간 페록시레독신 II(C51S, ΔC-ter, DM)를 나타낸 것으로서, C는 시스테인을, S는 세린잔기를 나타낸다. 그리고 와이에프(YF)는 카르복시 말단에 존재하는 6개의 아미노산 잔기로 구성된 모티프(motif)를 나타낸 것이다.

상기 공지된 결과에 기초하여, 인간 페록시레독신 II 단백질의 시스테인51번 잔기가 세린으로 돌연변이 된 단백질(C51S-hPrx II)과 YF-모티프를 포함하는 카르복시 말단의 6개의 아미노산이 잘려진 돌연변이(ΔC-ter)단백질, 그리고 활성을 나타내는 시스테인과 카르복시 말단의 두 곳 모두가 돌연변이 된 단백질(DM)을 준비했다(도 12A 참조). 박테리아에서 발현시킨 재조합 단백질을 이용해서 여러 가지 농도의 과산화수소가 존재할 때 이 단백질의 구조적, 기능적 전환을 알아보았다. 원래 형태의 인간 페록시레독신 II와 비교해서 돌연변이 세종류(C51S, ΔC-ter, DM) 모두는 티오레독신(Trx), 티오레독신 리덕타제(TR) 그리고 NADPH를 포함한 티오레독신 체계의 존재하에서 과산화수소를 처리했을 때에도 반응하지 않았다(도 12B 참조). 게다가 카르복시 말단이 잘려진 인간 페록시레독신 II(ΔC-ter)의 단백질 경우 과산화수소를 분해하는 퍼록시다제 활성은 높은 농도의 과산화수소에 의해 비활성화 되지 않았다. 반면 본래의 구조를 가진 인간 페록시레독신 II의 퍼록시다제 활성은 과산화수소에 의해 현저하게 감소했다(도 12C 참조). 카르복시 말단이 절단된 인간 페록시레독신 II 단백질은 산화에 민감한 상태에서 과산화에 저항성을 나타내는 형태로 전환 되었다는 것을 알 수 있었다. 예상했던 것처럼 시스테인 51 잔기가 세린으로 돌연변이 된 단백질의 경우 과산화수소를 분해할 수 없었다. 반대로, 티오레독신 체계의 존재하에서 원래 형태의 인간 페록시레독신 II의 사페론 활성은 과산화 수소의 농도가 증가할수록 현저하게 증가했다. 반면에 시스테인 51 잔기가 돌연변이 된 단백질(C51S-hPrx II)과 카르복시 말단이 잘려진 단백질(ΔC-ter), 그리고 두 가지 모두가 돌연변이 된 단백질(DM)은 과산화수소의 농도에 영향을 받지 않았다(도 12D 참조).

이 같은 결과는 인간 페록시레독신 II의 촉매자리 시스테인이 그 단백질의 구조적, 기능적 전환을 유도하는 효과적인 과산화수소 감지기로 작용한다는 것을 예측 할 수 있다. 그리고 YF-모티프(YF-motif)를 포함하는 카르복시 말단에 의해 중개되는 구조적인 변화는 실험관내의 산화적 스트레스에 대한 반응에서 결정적이다. 이 같은 결과는 효모의 2-시스테인 페록시레독신 I이 시스테인 의존성과 비의존성 과정에 의해 사페론 활성이 조절되는 결과와 부합한다(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004). 주목 할 것은 카르복시 말단의 영역이 없는 박테리아의 2-시스테인 페록시레독신은 산화적 비활성화에 내성이 강하다(Wood et al., Science, 300: 650-653, 2003). 그러므로 여분의 카르복시 말단의 YF-모티프를 가지고 있어서 산화적 스트레스에 민감한 포유류의 2-시스테인 페록시레독신의 존재는 진핵세포의 진화 동안에 이 구조적, 기능적 조절 기작이 점차 선택되어 바뀌었다는 것을 나타낸다.

[실시예 15] 생체내에서 인간 페록시레독신 II의 산화적 스트레스 의존적인 고분자 복합체 형성

효모의 2-시스테인 페록시레독신 I과 II (cPrx I, II)의 단백질 구조와 기능이 생체내에서 산화적 스트레스에 민감하게 반응하기 때문에(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004) 인간 페록시레독신 2 역시 비슷하게 조절되는지를 확인해 보고자 하였다. 해답을 찾기 위해 여러 가지 농도의 과산화수소가 처리된 헬라 세포(HeLa cell)로부터 추출한 단백질을 무변성 전기영동법과 인간 페록시레독신 II의 항체를 이용한 이뮤노 블롯(immunoblotting)을 수행하였다. 과산화수소를 처리하지 않은 헬라 세포로부터 추출한 인간 페록시레독신 II 단백질은 작은 단백질구조와 다중 단백질 구조의 다양한 형태로 존재한다(도 13A 왼쪽 패널에 있는 lane 1 참조). 반면에 과산화수소에 노출되면 과산화수소의 농도에 의존적으로 20분 안에 대부분의 단백질이 고분자량의 복합체로 전환된다(도 13A 왼쪽 패널 참조). 설퍼닐화(sulfinylation)와 설퍼닐화(sulfonylation)에 특이적으로 반응하는 페록시레독신 항체(Prx-SO₃-Ab)를 사용하여 과산화수소에 의해 유도되는 고분자량 복합체가 인간 페록시레독신 II의 시스테인 잔기에 존재하는 티올(thiol)기의 과산화에 의해 일어난다는 것을 확인하였다(도 13A 오른쪽 패널 lane 2,3 참조)(Woo et al., J. Biol. Chem., 278: 47361-47364, 2003). 따라서 인간 페록시레독신 II의 산화된 상태를 확인 하기위해 헬라 세포로부터 분리한 단백질을 2D-겔(gels)로 분리한 후 인간 페록시레독신의 항체와 Prx-SO₃ 항체를 이용하여 이뮤노 블롯을 수행하였다. 대부분의 인간 페록시레독신 II 단백질은 과산화수소가 없는 상태에서 환원된 형태로 존재하였지만 0.2mM의 과산화수소에 노출되자 현저하게 환원된 형태는 줄어들고 산화된 형태가 증가하였다(도 4B 왼쪽 패널 참조). 과산화수소에 의한 인간 페록시레독신 II의 과산화는 Prx-SO₃ 항체를 사용하여 확인 했다(도 4B 오른쪽 패널 참조).

도 13C에 도시된 바와 같이, 배지로부터 과산화수소를 제거 했을 때, 과산화수소의 매개로 생성된 인간 페록시레독신 II의 고분자량 복합체는 40분 안에 원래의 구조로 돌아갔다(도 13D 참조). 위와 같은 결과로부터 볼 때 인간 페록시레독신 II

의 단백질 구조는 가역적으로 산화적 스트레스에 의해 조절되고 그 구조적 변화가 기능적인 변화를 불러오기 때문에, 이 단백질의 ROS-의존적인 퍼옥시다제 기능의 비활성화(도 12C 참조)는 촉매과정의 마지막 단계가 아니고 또 다른 기능인 분자 샤페론의 기능을 가지기 위한 또 다른 조절 기작이라는 것을 알 수 있었다.

[실시예 16] 과산화수소에 의해 매개되는 인간 페록시레독신 II의 고분자량 복합체는 효모 세포에서도 형성은 되지만 원래의 구조로 되돌아 가지 않는다.

과산화수소에 의해 매개되는 인간 페록시레독신 II의 고분자량 복합체가 효모에서도 일어나는지 알아보기 위해 Gal1 프로모터(promoter)의 조절하에 효모에서 인간 페록시레독신 II를 발현시켰다. 효모 세포에서 발현된 인간 페록시레독신 II의 단백질 구조는 무변성 전기영동과 인간 페록시레독신 II의 항체를 사용한 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 알아본 결과 헬라 세포에서 발현되는 형태와 약간 달라보였다(도 5A 참조). 효모세포에서는 중간크기의 인간 페록시레독신 II 단백질의 구조가 더 적은 양으로 나타났다. 인간 페록시레독신 II를 발현시킨 효모 세포를 도 13의 패널 C에 나타낸 것과 같이 0.2mM의 과산화수소에 노출 시켰을 때, 20분안에 과산화수소에 의해 많은 양의 저 분자량의 단백질이 고 분자량의 단백질 복합체로 전환되었다. 인간 페록시레독신 II의 경우 긍정적인 대조군(positive control)으로 사용한 효모의 2-시스테인 페록시레독신(cPrxI)과 비교 했을 때 적은 양이 과산화수소에 의해 고분자량 복합체로 전환되었다(Jang et al., Cell, 117: 625-635, 2004)(도 14B 참조). 특히 cPrxI의 단백질 구조가 가역적으로 조절되는 반면(도 14B lane 3 참조), 인간 페록시레독신 II의 고분자량 복합체는 같은 실험조건하에서 효모로부터 과산화수소를 제거 한 후 40분이 지나도 원래의 구조로 돌아가지 않았다(도 14A lane 3 참조). 이 결과는 효모의 티오레독신(Trx)이 cPrxI과 hPrxII의 과산화수소에 의한 고분자량 복합체의 형성을 위해 사용될 수 있지만, 효모의 셀피레독신(Srx1)은 생체내에서 고분자량 복합체를 풀어준다고 알려진 포유류의 셀피레독신(Srx)(Chang et al., J. Biol. Chem., 279: 50994-51001, 2004)이나 세스트린(sestrin)(Budakov et al., Science, 304: 596-600, 2004)의 기능을 대신하지는 못한다는 것을 나타낸다.

[실시예 17] 인간 페록시레독신 II의 샤페론 기능은 과산화수소에 의해 유발되는 세포 죽음으로부터 헬라 세포를 보호한다.

세포에 독성을 나타내지 않는 정도의 낮은 과산화수소 농도에서도 생체내에서 인간 페록시레독신 II의 구조적 기능적 전환이 일어난다(도 13 참조). 인간 페록시레독신 II의 퍼옥시다제에서 샤페론으로의 기능적 전환의 생리적 중요성을 알아보기 위해 아미노 말단에 6개의 히스티딘(his) 꼬리표를 포함하게 만들기 위해 4종류의 인간 페록시레독신 II DNA(도 12A 참조)를 pcDNA3.1 벡터(vector)에 삽입하였다. 그 DNA는 각각 헬라 세포에 형질전환 시켰고, 네 종류의 인간 페록시레독신 II 단백질이 안정적으로 과 발현되는 세포를 선별했다. 형질전환된 헬라 세포에서 인간 페록시레독신 II의 발현량은 이뮤노 블롯을 통해 확인한 결과 빈 벡터만으로 형질 전환된 표본 세포와 비교했을 때 2~3배가 증가되었다(결과 보이지 않음). 게다가 인간 페록시레독신 II의 시스테인51번이 세린으로 바뀐 돌연변이(C51S)와 카르복시 말단이 잘려진 돌연변이(Δ C-ter), 두 가지 모두가 돌연변이된 단백질(DM) 모두가 본래 모습의 hPrxII 단백질의 발현량과 비슷하게 발현되었다- SDS 첨가 변성 전기영동법과 히스티딘(his)-꼬리표(tag) 항체를 이용한 웨스턴 블롯의 수행으로 확인하였다(도 15A 아래쪽 패널). 전기영동 겔에서 동일 양의 단백질이 올려졌는지는 베타-액틴(β -actin) 항체를 이용한 이뮤노 블롯에서 재확인 했다.

그리고, 1mM의 과산화수소를 처리한 헬라 세포에서 인간 페록시레독신 II의 단백질 구조와 세포의 생존율을 TUNEL 분석에 의해 알아보았다. 무변성 전기영동법과 히스티딘 꼬리표(his-tag) 항체를 이용한 이뮤노 블롯을 수행한 결과 본래의 인간 페록시레독신 II (native-hPrxII)는 과산화수소 처리 후 20분 안에 작거나 혹은 중합체(oligomer)의 구조에서 고분자량 구조로 전환 하였고 이 구조는 적어도 생체내에서 12시간 유지되었다(결과 보이지 않음). 그러나 C51S, Δ C-ter, DM의 돌연변이 인간 페록시레독신 II 단백질에 존재하는 작은 분자량의 구조는 과산화수소에 영향을 받지 않았다. 이 같은 결과는 촉매자리 시스테인과 YF-모티프를 포함하는 인간 페록시레독신 II의 카르복시 말단이 과산화수소에 의해 생성되는 고분자량 복합체의 형성에 있어서 실험관(in vitro) 내(도 12B 참조)와 생체(in vivo) 내에서도(도 15A 참조) 똑같이 작용한다는 것을 말해준다. 세포의 생존율을 알아보았을 때, 과산화수소에 매우 민감한-빈 벡터로 형질전환 되거나 야생형의 헬라세포의 경우 12시간 안에 약 70%의 세포가 TUNEL 분석에서 양성으로 나타났다(도 15B 와 D 참조). 대조적으로 본래의 인간 페록시레독신 II가 과발현 된 세포의 경우 똑같은 조건에서 과산화수소에 의해 생성되는 세포죽음에 현저한 저항성을 나타내었다(도 15C 참조). 이것은 아마도 산화적 스트레스로부터 기질의 변성을 인간 페록시레독신 II가 샤페론 기능으로 보호했거나, 인간 페록시레독신 II의 고분자량 형태가 과산화수소에 의해 일어나는 세포죽음을 막을 수 있는 방어 신호 체계의 하부를 활성화 시켰기 때문일 것이다. 이 같은 결과는 비록 세포 내 보호기능이 이 단백질의 샤페론 활성화와 연관 짓지는 않았지만 쥐의 갑상선 세포(FRTL-5)(Kim et al., J. Biol. Chem., 275: 18266-18270, 2000)와 쥐의 결합조직형성 세포(fibroblast)에서(Mu et al., J. Biol. Chem., 277: 43175-43184, 2002) 포유류의 페록시레독신 I과 II가 세포 내 보호 기능을 한다고 알려진 이전의 보고와 부합된다. 인간 페록시레독신 II의 C52S, Δ C-ter, DM의 돌연변이 단백질을

발현시킨 헬라 세포의 생존율은 본래의 인간 페록시레독신 II를 발현시킨 세포보다는 현저히 낮지만, 빈 벡터로 형질전환된 표본 세포보다는 높았다(도 15C 와 D 참조). 이 같은 결과는 돌연변이 단백질역시 기본적인 사페론 활성(도 12D 참조)을 가지기 때문에 산화적인 스트레스로부터 세포를 어느 정도 보호 한다는 것을 예측할 수 있다.

똑같은 의미에서 여러 가지 형태의 인간 페록시레독신 II가 발현된 헬라 세포에 1mM의 과산화수소를 처리한 후 PARP의 잘려지는 경향을 PARP의 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 핵에서 히스톤(histone) 혹은 비히스톤(non-histone) 단백질에 ADP-라이보실 다중화(poly(ADP-ribosyl)ation)을 촉매하는 단백질인 PARP는 p53의 유도과 아파토시스(apoptosis)에 관여한다(Tewari et al., Cell, 81: 801809, 1995). 그러므로, 85kDa와 24kDa의 두 조각으로 잘려지는 PARP의 특이적인 단백질 분해는 프로그램된 세포 사멸(programmed cell death)과 밀접한 관계가 있다(Nicholson et al., Nature, 376: 3743, 1995). 이 실험에서 과산화수소를 처리하지 않은 헬라 세포에는 116kDa의 분자량을 가지는 완전한 PARP가 존재하지만, 과산화수소를 처리하면 85kDa로 잘려지게 된다(도 15E 참조). 빈 벡터로 형질 전환된 헬라 세포의 경우 1mM의 과산화수소에 노출될 경우 85kDa의 조각이 현저히 증가하지만 본래모습의 인간 페록시레독신 II를 발현시킨 곳에서는 과산화수소를 처리하더라도 잘려지는 PARP의 양이 현저하게 줄어든다. 상대적으로 C51S, ΔC-ter, DM의 인간 페록시레독신 II 돌연변이 단백질의 경우 잘려지는 PARP의 양이 빈 벡터와 본래모습의 인간 페록시레독신 단백질 사이에서 나타난다. 종합하면 인간 페록시레독신 II 단백질의 사페론 기능은 활성산소종에 의해 일어나는 세포사멸에서 인간 세포를 효과적으로 보호한다.

발명의 효과

이상과 같이, 본 발명은 2-시스테인 페록시레독신은 활성산소종을 제거하는 퍼옥시다제와 단백질의 폴림을 방지하는 사페론의 두가지 기능을 가지고 있으며, 이러한 기능들은 단백질의 3, 4차구조의 동적인 전환과 관련있음을 입증하였고, 2-시스테인 페록시레독신 I (cPrxI) 단백질과 인간 페록시레독신 I-IV (hPrxI-IV) 단백질의 구조와 기능적인 변화는 열충격과 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소종(ROS)에 의해 민감하게 조절됨을 알 수 있었다.

그리고, 2-시스테인 페록시레독신의 사페론 기능은 저분자량의 2-시스테인 페록시레독신이 외부 스트레스로부터 구조변형을 통해 고분자량 복합체로 형성되어야 활성되는 것을 알 수 있었다.

이때, 2-시스테인 페록시레독신 단백질의 발현과, 이의 고분자 복합체의 형성은 열 충격 및 산화적 스트레스의 저항성 이외에도 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 갑상선암, 심장암, 폐암, 종양의 보호 등 여러 가지의 병들의 유발과 밀접한 관계가 있음을 증명함으로써, 여러 가지 질병들로부터 세포를 보호할 것이라는 것을 강하게 추정할 수 있고, 산화적 충격의 조건하에서 거대 분자 다중체로 변환 시에는 이 2-시스테인 페록시레독신 단백질이 활성산소종의 탐침 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 또한, 진핵 세포의 2-시스테인 페록시레독신에만 존재하는 카르복시 말단의 와이에프-모티프(YF-Motif) 역시 이 단백질이 거대 분자 다중체로 구조적 변화를 일으키는데 필수적이라는 것을 알 수 있었다. 그리고, 대부분의 작은 분자다중체가 모두 거대 분자다중체로 구조변화가 일어남으로써 이 단백질은 슈퍼 사페론의 기능을 보여줄 수 있다.

그리고, 본 발명에서는 파킨슨 병과 알츠하이머 병에서 발견되는 로우위체 (Lewy bodies)의 중요한 구성인자인 알파시뉴클레인 (α-synuclein)의 뭉침과 산화 충격에서 유도되어지는 단백질의 폴림을 방지할 수 있었다. 그리고 인간 페록시레독신 II(hPrx II)를 과발현 시킨 헬라(Hela)세포에서 산화적 스트레스에 의해 일어나는 아파토시스(apoptosis)가 현저히 줄어들었다.

따라서, 본 발명에 따른 2-시스테인 페록시레독신 단백질 고분자 결합체와 이를 특이하게 인지하는 항체를 이용하면 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 갑상선암, 심장암, 폐암, 종양 등의 다양한 질병에 대한 새로운 진단방법이나 치료제 등을 개발하게 되었으며, 이 유전자를 도입한 형질전환 동물세포의 제조는 다양한 질병이나 환경스트레스에 저항성을 가지는 형질 전환 동물의 제조를 가능하게 할 것으로 예상된다.

한편, 2-시스테인 페록시레독신 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 제조는 다양한 질병이나 환경스트레스에 저항성을 가지는 식물체의 제조를 가능하게 하는 효과가 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

동물, 식물 또는 미생물에 존재하는 2-시스테인 페록시레독신 단백질간의 결합으로 이루어지고, 샤페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 아미노산서열의 결합은 동종 또는 이종간에 결합하는 것을 특징으로 하는 샤페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체.

청구항 3.

제 2 항에 있어서,

서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 11 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 적어도 1종 이상 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 결합하여 이루어지고, 샤페론 활성을 갖는 2-시스테인 페록시레독신 고분자성 결합체.

청구항 4.

서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 11 및 12로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 적어도 1종 이상 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환체.

청구항 5.

제 4 항에 있어서,

형질전환된 대장균(*E.coli*/pGEX-cPrxI; 수탁번호 KCTC 10645BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 6.

제 4 항에 있어서,

형질전환된 대장균(*E.coli*/pGEX-hPrxII; 수탁번호 KCTC 10793BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 7.

제 4 항에 있어서,

서열번호 2, 4, 6 및 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 적어도 1종 이상 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 인간 세포주에 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환체.

청구항 8.

제 4 항에 있어서,

아그로박테리움 투머파시엔스 EHA101인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 9.

제 8 항의 아그로박테리움 투머파시엔스를 도입하여 2-시스테인 페록시레독신을 과량으로 발현하는 형질전환 식물 세포주.

청구항 10.

제 1 항 기재의 결합체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 단일클론항체.

청구항 11.

제 10 항에 있어서,

서열번호 2, 4, 6, 및 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 적어도 1종 이상 선택된 2-시스테인 페록시레독신 단백질간의 결합체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 단일클론항체.

청구항 12.

제 10 항 기재의 단일클론항체를 피검체의 시료와 면역반응시켜, 피검체의 시료 내 페록시레독신 결합체의 양을 측정하여 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서,

상기 단일클론항체는 서열번호 2, 4, 6 및 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 2-시스테인 페록시레독신 단백질 이성질체 군에서 선택된 단백질 간의 결합으로 사페론 활성을 갖는 페록시레독신 결합체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 단일클론항체인 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법.

청구항 14.

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,

상기 피검체의 시료는 사람, 동물, 식물, 미생물의 조직이나 체액에서 적출한 세포를 파쇄하거나 용융하여 수득한 단백질인 것을 특징으로하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법.

청구항 15.

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,

상기 면역반응은 피검체의 시료를 무변성 전기영동(native-PAGE)으로 단백질을 분리하고 니트로셀룰로오스막 상의 일정 위치에 블롯팅한 다음, 블롯팅한 막 상에 특이적으로 결합하는 항체의 위치나 양을 효소나 염료로 염색하여 가시화함으로써, 시료 내 페록시리독신 결합체의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법.

청구항 16.

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,

상기 질병은 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 갑상선암, 심장암, 폐암, 종양, 열 충격(heat shock), 활성 산소종(reactive oxygen species), 간암, 유방암, 자궁암 또는 폐암인 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무의 진단방법.

청구항 17.

피검체의 시료, 양성 및 음성대조구 시료를 무변형 전기영동법으로 단백질을 분리한 겔과; 상기 겔의 라인 수에 맞는 니트로셀룰로오스막을 다수 부착하고 콤 카드(comb card)와; 겔 상의 단백질을 전기적으로 니트로셀룰로오스막에 전이하는 전기장치와; 니트로셀룰로오스막 상에서 제 10 항 또는 제 11 항 기재의 단일클론항체와; 상기 단일클론항체가 니트로셀룰로오스 막 상에 전이된 단백질과 인지할 수 있도록 배양트레이(incubation tray)를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 존재 유무를 진단하는 키트.

청구항 18.

제 10 항 또는 제 11 항 기재의 단일클론항체를 고정상으로 갖는 반응부(11)와 정상동작여부를 판단하기 위한 대조부(12)가 전개막(13)상의 소정영역에 구비된 스트립(1); 및

상기 스트립(1)을 수납하며, 적어도 피검체 시료를 투입하기 위한 시료 투입부(21)와 스트립상의 반응부(11)와 대조부(12)에서의 반응결과를 육안 관찰하기 위한 표시창(22)이 구비된 하우징(2)을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 피검체의 질병 유무를 진단하는 키트.

청구항 19.

- (a) 피검체에서 처리한 시료로 이루어지는 고정상 시료;
- (b) 제 10 항 또는 제 11 항 기재의 2-시스테인 페록시리독신 고분자성 결합체를 항원으로 인식하는 단일클론항체;
- (c) 상기 항체와 특이적으로 결합하는 발색효소가 부착된 상보성 물질;
- (d) 발색효소와 반응하여 발색되는 기질 반응액; 및
- (e) 반응 유지 완충용액과 배양용기를 포함하여 이루어지는 피검체의 질병유무를 진단하는 시약.

청구항 20.

제 19 항에 있어서,

상기 고정상 시료는 통상의 웨스턴 블랏의 방법으로, 피검체의 시료를 무변형 전기영동법으로 분리한 단백질을 겔로부터 전기적으로 니트로셀룰로오스막에 전이한 것임을 특징으로 하는 피검체의 질병유무를 진단하는 시약.

청구항 21.

제 3 항 기재의 페록시레독신 결합체 또는 그의 염을 유효성분으로, 약제학적으로 허용된 담체를 포함하여 이루어지는 뇌 신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료하는 약제학적 조성물.

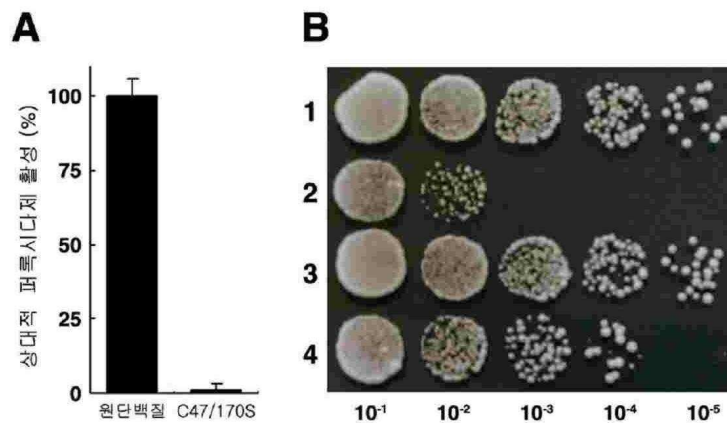
청구항 22.

제 7 항 기재의 형질전환체; 및

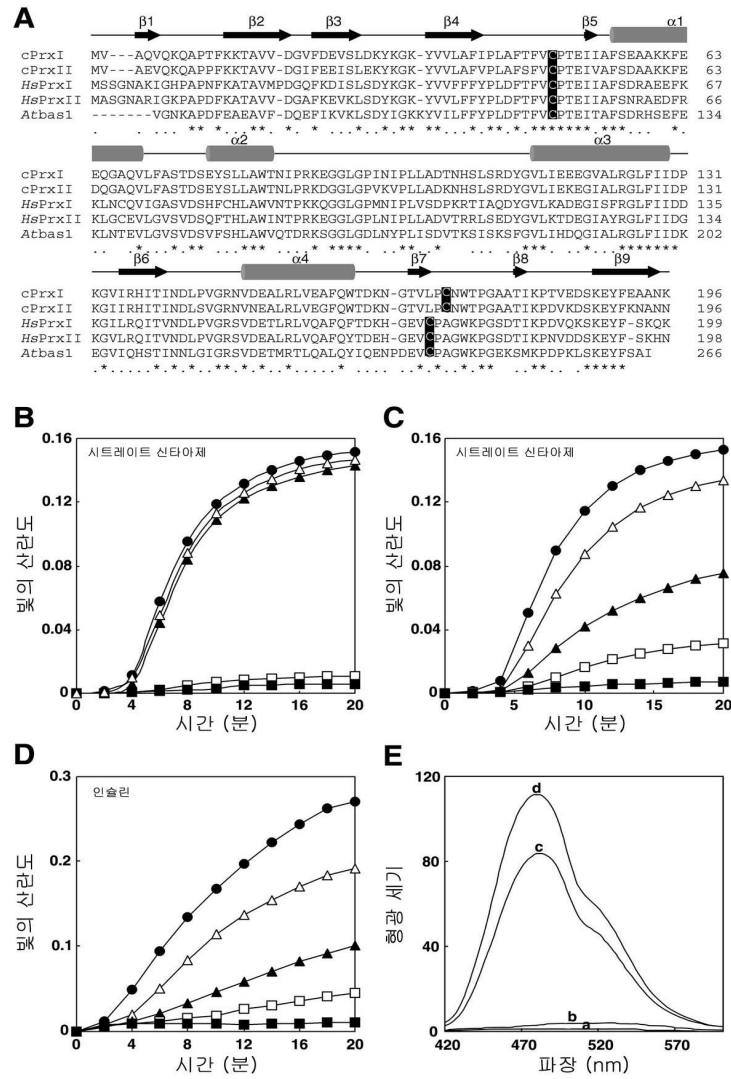
약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 이루어지는 뇌신경퇴화, 알츠하이머 병, 다운신드롬, 파킨슨 병, 갑상선암, 심장암, 유방암, 폐암, 종양을 예방 또는 치료하는 약제학적 조성물.

도면

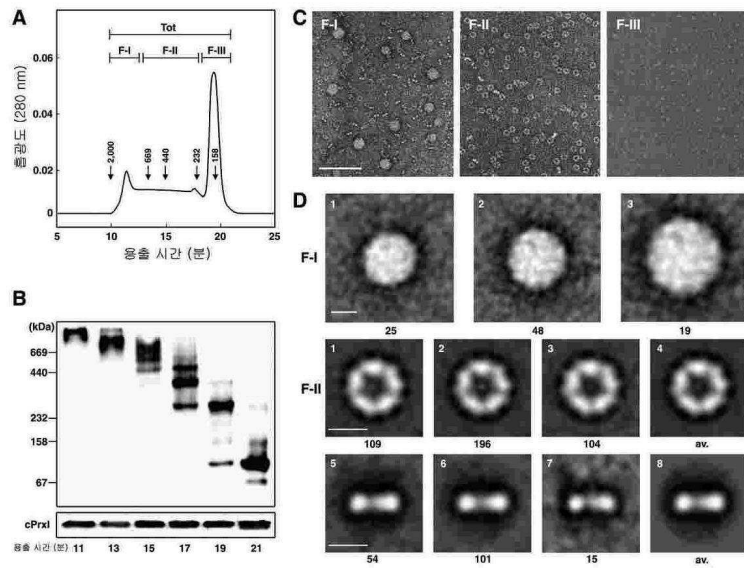
도면1



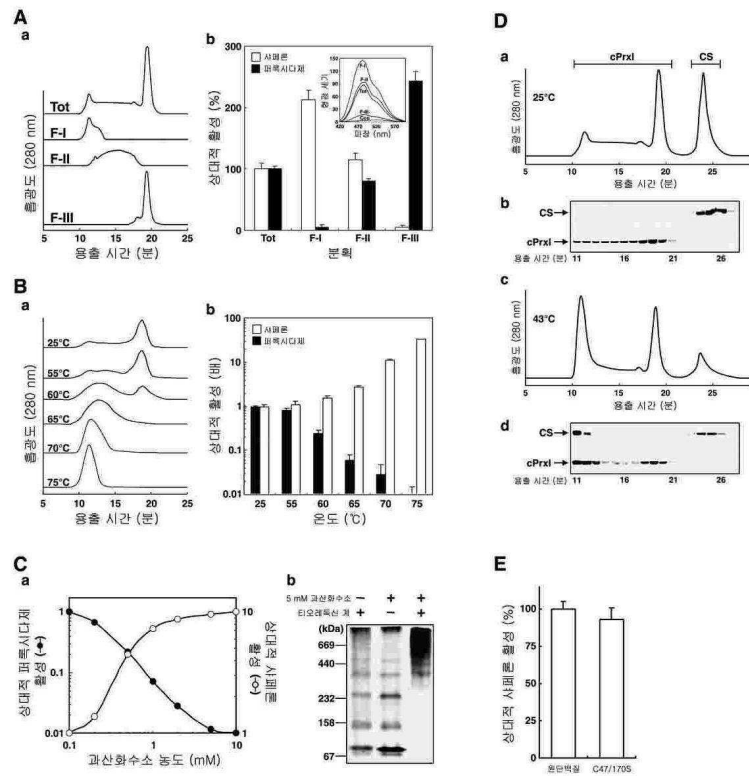
도면2



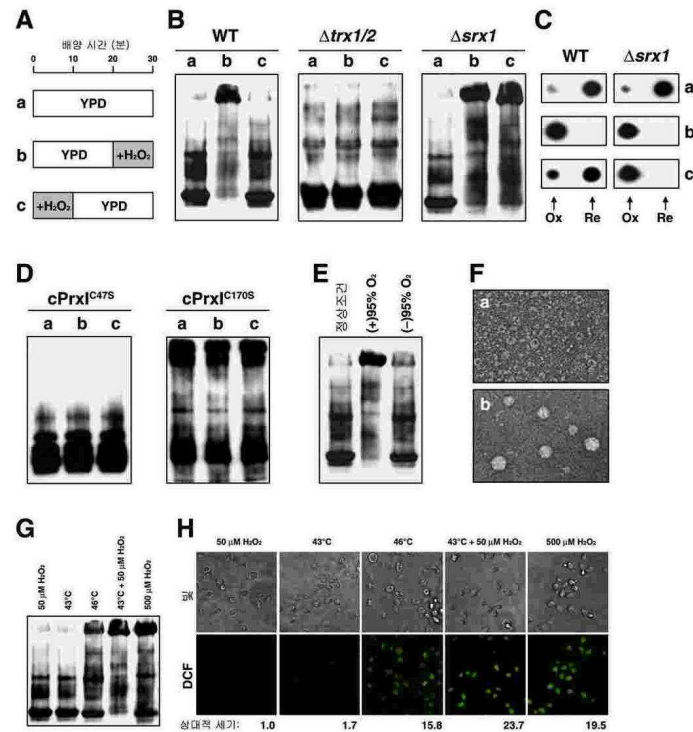
도면3



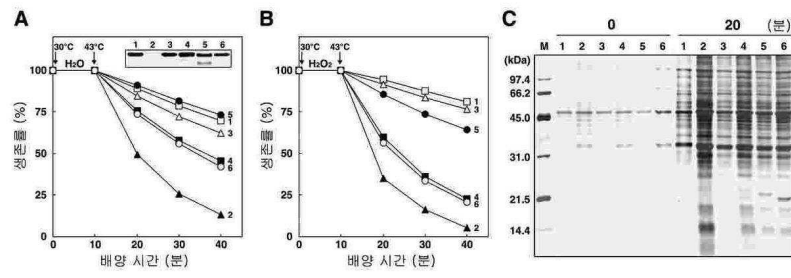
도면4



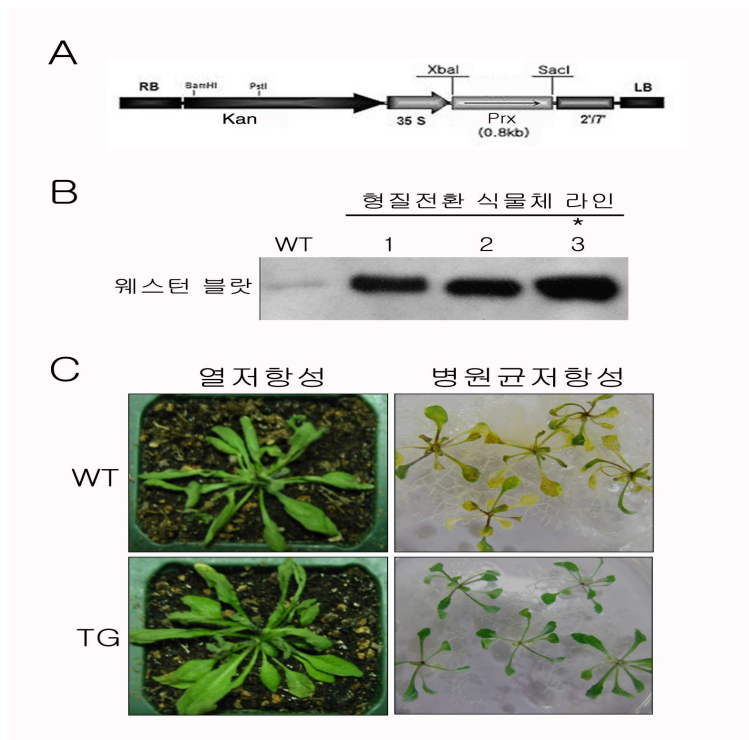
도면5



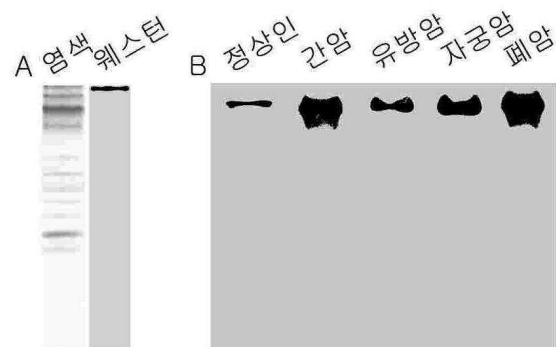
도면6



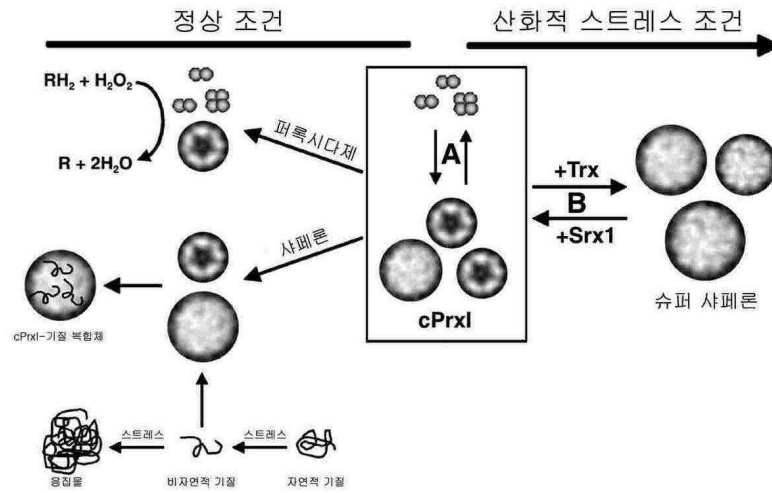
도면7



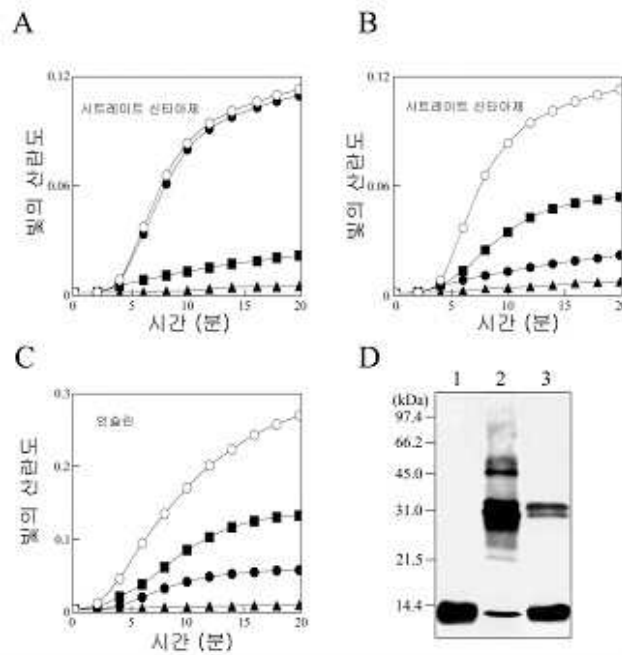
도면8



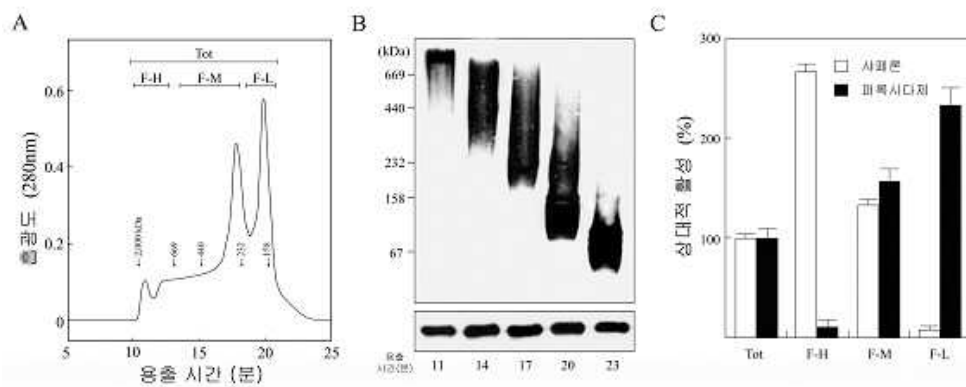
도면9



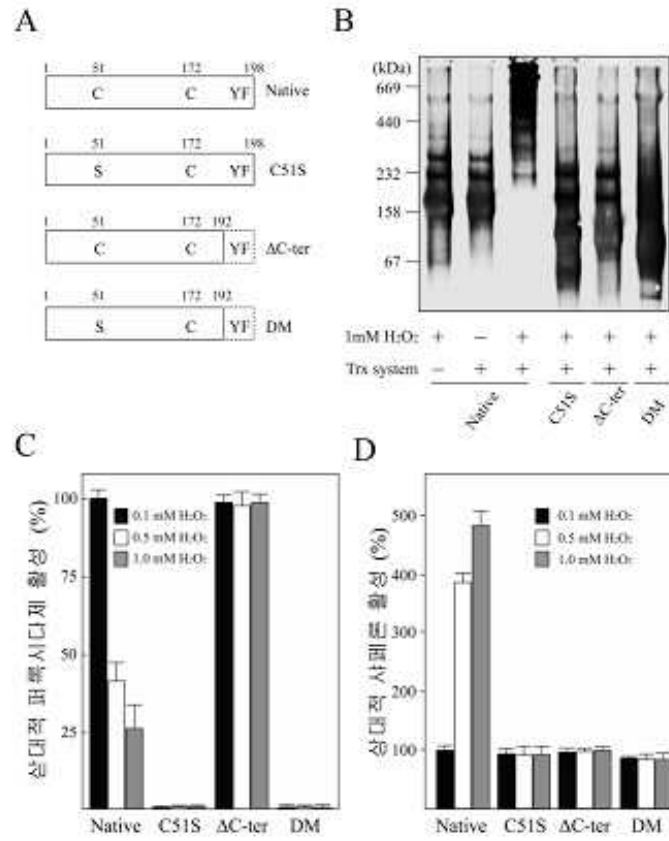
도면10



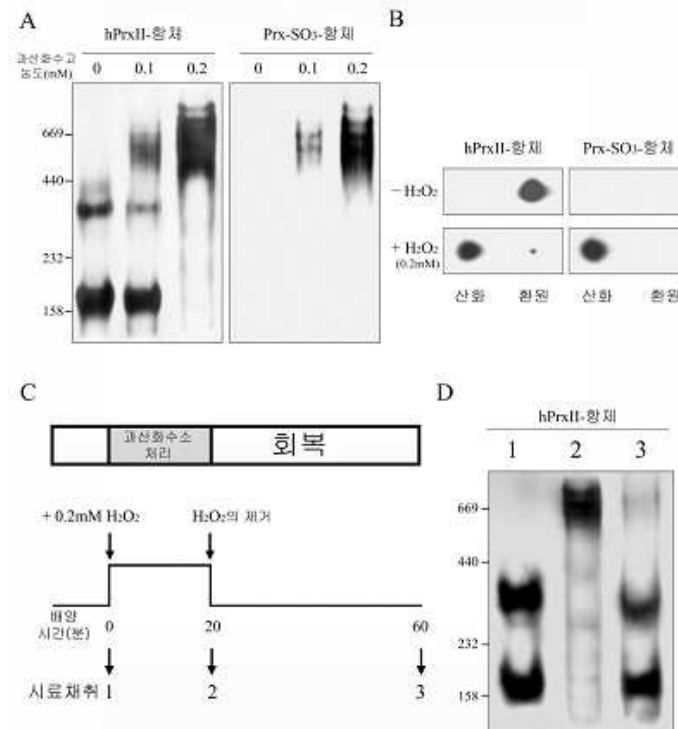
도면11



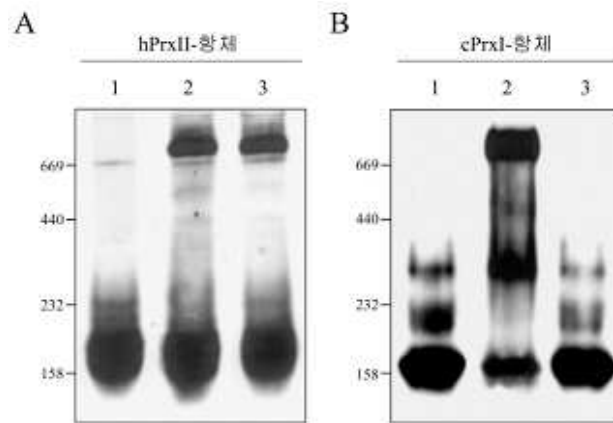
도면12



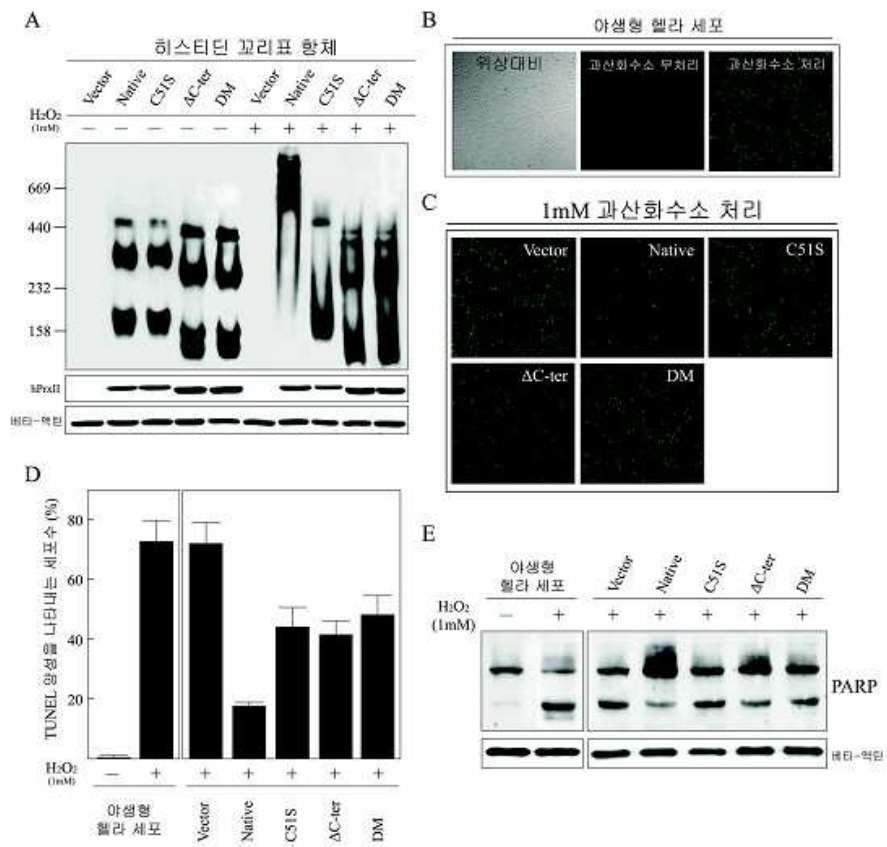
도면13



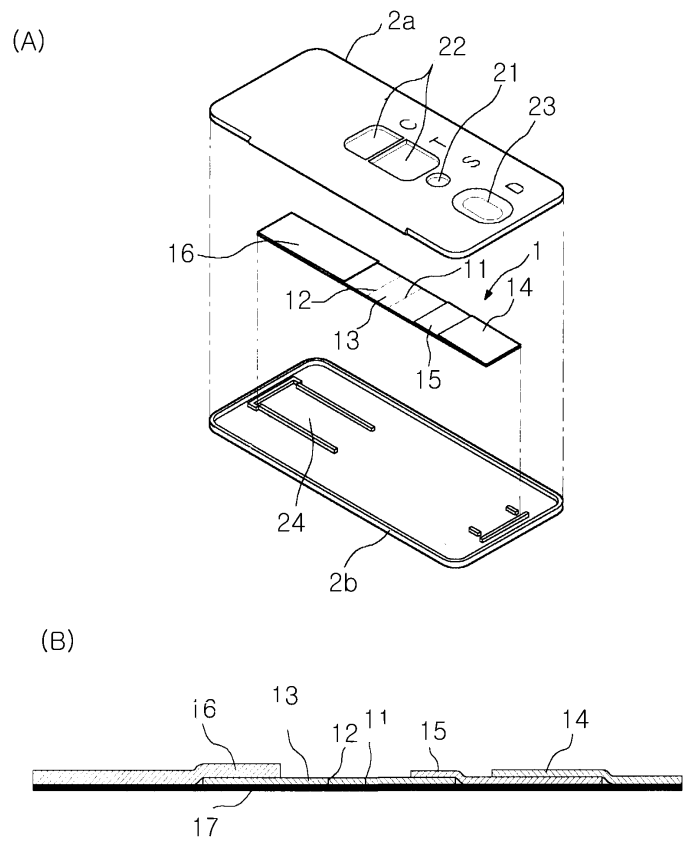
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GTEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> 2-cystein peroxiredoxin complex exhibiting function acting as a molecular chaperone
- <160> 12
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1262
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> gene
- <222> (341) .. (937)
- <223> Peroxiredoxin 1
- <300>

<308> NM_002574

<400> 1

actctcgcga gatccctact ggctataaag gcagcgcccc ggagagctct tgcgcgtctt	60
gttcttgcct ggtgtcgggtg gttagtttct gcgacttgtg ttgggactgg tgagtgtggg	120
cagtgcggcc cctgcggagt gaggcgcggc gcgccttctt tgctgttgc ctcttcctcc	180
tcctgtccgg ggcccgcccg cgctcgggtg ggggtgctgt gatgcgtgag gcagccgggg	240
gaggcccgga gtccgagact gcttgagcgc tgcgcacacc cctctcgtgg gccccccacg	300
taggtgcggg aacctgggtg aaccccaagc tgataggaag atgtcttcag gaaatgctaa	360
aattgggcac cctgccccca acttcaaagc cacagctgtt atgccagatg gtcagtttaa	420
agatatcagc ctgtctgact acaaaggaaa atatgttgtg ttcttctttt accctcttga	480
cttcaccttt gtgtgcccc aaggagatcat tgctttcagt gatagggcag aagaatttaa	540
gaaactcaac tgccaagtga ttggtgcttc tgtggattct cacttctgtc atctagcatg	600
ggtcaataca cctaagaaac aaggaggact gggacccatg aacattcctt tggatcaga	660
cccgaagcgc accattgctc aggattatgg ggtcttaaag gctgatgaag gcatctcgtt	720
caggggcctt tttatcattg atgataaggg tattcttcgg cagatcactg taaatgacct	780
ccctgttggc cgctctgtgg atgagacttt gagactagtt caggccttcc agttcactga	840
caaacatggg gaagtgtgcc cagctggctg gaaacctggc agtgatacca tcaagcctga	900
tgtccaaaag agcaaagaat atttctccaa gcagaagtga gcgctgggct gttttagtgc	960
caggctgcgg tgggcagcca tgagaacaaa acctcttctg tatttttttt ttccattagt	1020
aaaacacaag acttcagatt cagccgaatt gtggtgtctt acaaggcagg cctttcctac	1080
agggggtgga gagaccagcc tttcttcctt tggtaggaat ggctgagtt ggcgttgtgg	1140
gcaggctact ggtttgtatg atgtattagt agagcaaccc attaatcttt tgtagtttgt	1200
attaaacttg aactgagacc ttgatgagtc tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aa	1262

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1) .. (199)

<223> Peroxiredoxin 1

<400> 2

Met Ser Ser Gly Asn Ala Lys Ile Gly His Pro Ala Pro Asn Phe Lys
1 5 10 15

Ala Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Gln Phe Lys Asp Ile Ser Leu Ser
20 25 30

Asp Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Phe Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe
35 40 45

Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asp Arg Ala Glu
50 55 60

Glu Phe Lys Lys Leu Asn Cys Gln Val Ile Gly Ala Ser Val Asp Ser
65 70 75 80

His Phe Cys His Leu Ala Trp Val Asn Thr Pro Lys Lys Gln Gly Gly
85 90 95

Leu Gly Pro Met Asn Ile Pro Leu Val Ser Asp Pro Lys Arg Thr Ile
100 105 110

Ala Gln Asp Tyr Gly Val Leu Lys Ala Asp Glu Gly Ile Ser Phe Arg
115 120 125

Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Val
130 135 140

Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val
145 150 155 160

Gln Ala Phe Gln Phe Thr Asp Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly
165 170 175

Trp Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asp Val Gln Lys Ser Lys
180 185 190

Glu Tyr Phe Ser Lys Gln Lys
195

<210> 3

<211> 1039

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> gene
 <222> (151) .. (744)
 <223> Peroxiredoxin 2

<300>
 <308> NM_005809

<400> 3
 gctcgtccgc tccctccccc gcgcgctgca cgtcttgggtt cgggccgggc ataaaaggct 60
 tcgcggccca gggctcactt ggcgctgaga acgcgggtcc acgcgtgtga tcgtccgtgc 120
 gtctagcctt tgcccacgca gctttcagtc atggcctccg gtaacgcgcg catcggaag 180
 ccagcccctg acttcaaggc cacagcgggtg gttgatggcg ccttcaaaga ggtgaagctg 240
 tcggactaca aagggaagta cgtggtcctc tttttctacc ctctggactt cacttttgtg 300
 tgccccaccg agatcatcgc gttcagcaac cgtgcagagg acttccgcaa gctgggctgt 360
 gaagtgtctgg gcgtctcggg ggactctcag ttcacccacc tggcttggat caacaccccc 420
 cggaaagagg gaggcttggg cccctgaac atccccctgc ttgctgacgt gaccagacgc 480
 ttgtctgagg attacggcgt gctgaaaaca gatgagggca ttgcctacag gggcctcttt 540
 atcatcgatg gcaagggtgt ccttcgccag atcactgtta atgatttgcc tgtgggacgc 600
 tccgtggatg aggctctgcg gctggtccag gccttccagt acacagacga gcatggggaa 660
 gtttgtcccg ctggctggaa gcctggcagt gacacgatta agcccaacgt ggatgacagc 720
 aaggaatatt tctccaaaca caattaggct ggctaacgga tagtgagctt gtgccctgc 780
 ctaggtgcct gtgctgggtg tccacctgtg cccccacctg ggtgccctat gctgaccag 840
 gaaaggccag acctgccct ccaaactcca cagtatggga ccctggaggg ctaggccaag 900
 gccttctcat gcctccacct agaagctgaa tagtgacgcc ctcccccaag cccaccagc 960
 cgcacacagg cctagaggta accaataaag tattagggaa aggtgtgaaa aaaaaaaaaa 1020
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1039

<210> 4
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1) .. (198)

<223> Peroxiredoxin 2

<400> 4

Met Ala Ser Gly Asn Ala Arg Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15

Ala Thr Ala Val Val Asp Gly Ala Phe Lys Glu Val Lys Leu Ser Asp
20 25 30

Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
35 40 45

Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asn Arg Ala Glu Asp
50 55 60

Phe Arg Lys Leu Gly Cys Glu Val Leu Gly Val Ser Val Asp Ser Gln
65 70 75 80

Phe Thr His Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu
85 90 95

Gly Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Ala Asp Val Thr Arg Arg Leu Ser
100 105 110

Glu Asp Tyr Gly Val Leu Lys Thr Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly
115 120 125

Leu Phe Ile Ile Asp Gly Lys Gly Val Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn
130 135 140

Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Gln
145 150 155 160

Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asn Val Asp Asp Ser Lys Glu
180 185 190

Tyr Phe Ser Lys His Asn
195

<210> 5

<211> 1530

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> gene
 <222> (7) .. (774)
 <223> Peroxiredoxin 3

<300>
 <308> AK22659

<400> 5
 ctgaagatgg cggtgctgt aggacggttg ctccgagcgt cggttgccc acatgtgagt 60
 gccattcctt ggggcatttc tgccactgca gccctcaggc ctgctgcatg tggaagaacg 120
 agcttgacaa atttattgtg ttctggttcc agtcaagcaa aattattcag caccagttcc 180
 tcatgccatg cacctgctgt caccagcat gcaccctatt ttaagggtag agccgttgct 240
 aatggagagt tcaaagacct aagccttgat gactttaagg ggaaatattt ggtgcttttc 300
 ttctatcctt tggatttcac ctttgtgtgt cctacagaaa ttgttgcttt tagtgacaaa 360
 gctaacgaat ttcacgacgt gaactgtgaa gttgtcgcag tctcagtgga ttcccacttt 420
 agccatcttg cctggataaa tacaccaaga aagaatggtg gtttgggcca catgaacatc 480
 gcactcttgt cagacttaac taagcagatt tcccagagact acggtgtgct gttagaaggt 540
 tctggtcttg cactaagagg tctcttcata attgaccca atggagtcac caagcatttg 600
 agcgtcaacg atctcccagt gggccgaagc gtggaagaaa ccctccgctt ggtgaaggcg 660
 ttccagtatg tagaaacaca tggagaagtc tgcccagcga actggacacc ggattctcct 720
 acgatcaagc caagtccagc tgcttccaaa gagtactttc agaaggtaaa tcagtagatc 780
 acccatgtgt atctgcacct tctcaactga gagaagaacc acagttgaaa cctgctttta 840
 tcattttcaa gatggttatt tgtagaaggc aaggaaccaa ttatgcttgt attcataagt 900
 attactctaa atgttttggt tttgtaattc tggctaagac cttttaaaca tggtagttg 960
 ctagtacaag gaatccttta ttggtaacat cttggtggct ggctagctag tttctacaga 1020
 acataatttg cctctataga aggctattct tagatcatgt ctcaatggaa acactcttct 1080
 ttcttagcct tacttgaatc ttgcctataa taaagtagag caacacacat tgaaagcttc 1140
 tgatcaacgg tcctgaaatt ttcattctga atgtctttgt attaaactga attttctttt 1200
 aagctaacaa agatcataat tttcaatgat tagccgtgta actcctgcaa tgaatgttta 1260

tgtgattgaa gcaaattgtga atcgtattat tttaaaaagt ggcagagtga cttaactgat 1320
catgcatgat ccctcatccc tgaaattgag tttatgtagt cattttactt attttattca 1380
ttagctaact ttgtctatgt atatttctag atattgatta gtgtaatcga ttataaagga 1440
tatttatcaa atccagggat tgcattttga aattataatt attttctttg ctgaagtatt 1500
cattgtaaaa catacaaaaat aaacatatatt 1530

<210> 6
<211> 256
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1) .. (256)
<223> Peroxiredoxin 3

<400> 6
Met Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His
1 5 10 15
Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro
20 25 30
Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser
35 40 45
Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala
50 55 60
Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly
65 70 75 80
Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val
85 90 95
Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
100 105 110
Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu
115 120 125
Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile
130 135 140
Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu
145 150 155 160

Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu
165 170 175

Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn
180 185 190

Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
195 200 205

Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr
210 215 220

His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile
225 230 235 240

Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln
245 250 255

<210> 7
<211> 954
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (48)..(860)
<223> Peroxiredoxin 4

<300>
<308> BC007107

<400> 7
agaagcggcg ctcgcgccaa gggacgtggt tctgcgctcg cgtgggtcatg gaggcgctgc 60
cgctgctagc cgcgacaact ccggaccacg gccgccaccg aaggctgctt ctgctgccgc 120
tactgctggt cctgctgccg gctggagctg tgcagggctg ggagacagag gagaggcccc 180
ggactcgcga agaggagtgc cacttctacg cgggtggaca agtgtacccg ggagaggcat 240
cccgggtatc ggtcgccgac cactccctgc acctaaagcaa agcgaagatt tccaagccag 300
cgccctactg ggaaggaaca gctgtgatcg atggagaatt taaggagctg aagttaactg 360
attatcgtgg gaaatacttg gttttcttct tctaccact tgatttcaca tttgtgtgtc 420
caactgaaat tatcgctttt ggcgacagac ttgaagaatt cagatctata aatactgaag 480

tggtagcatg ctctgttgat tcacagttta cccatttggc ctggattaat acccctcgaa 540
 gacaaggagg acttgggcca ataaggattc cacttctttc agatttgacc catcagatct 600
 caaaggacta tgggtgtatac ctagaggact caggccacac tcttagaggt ctcttcatta 660
 ttgatgacaa aggaatccta agacaaatta ctctgaatga tcttcctgtg ggtagatcag 720
 tggatgagac actacgtttg gttcaagcat tccagtacac tgacaaacac ggagaagtct 780
 gccctgctgg ctggaaacct ggtagtgaaa caataatccc agatccagct ggaaagctga 840
 agtatttcga taaactgaat tgagaaatac ttcttcaagt tatgatgctt gaaagttctc 900
 aataaagttc acggtttcat taccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 954

<210> 8
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(271)
 <223> Peroxiredoxin 4

<400> 8
 Met Glu Ala Leu Pro Leu Leu Ala Ala Thr Thr Pro Asp His Gly Arg
 1 5 10 15
 His Arg Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ala
 20 25 30
 Gly Ala Val Gln Gly Trp Glu Thr Glu Glu Arg Pro Arg Thr Arg Glu
 35 40 45
 Glu Glu Cys His Phe Tyr Ala Gly Gly Gln Val Tyr Pro Gly Glu Ala
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Val Ala Asp His Ser Leu His Leu Ser Lys Ala Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Trp Glu Gly Thr Ala Val Ile Asp Gly
 85 90 95
 Glu Phe Lys Glu Leu Lys Leu Thr Asp Tyr Arg Gly Lys Tyr Leu Val
 100 105 110
 Phe Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
 115 120 125

Ile Ala Phe Gly Asp Arg Leu Glu Glu Phe Arg Ser Ile Asn Thr Glu
130 135 140

Val Val Ala Cys Ser Val Asp Ser Gln Phe Thr His Leu Ala Trp Ile
145 150 155 160

Asn Thr Pro Arg Arg Gln Gly Gly Leu Gly Pro Ile Arg Ile Pro Leu
165 170 175

Leu Ser Asp Leu Thr His Gln Ile Ser Lys Asp Tyr Gly Val Tyr Leu
180 185 190

Glu Asp Ser Gly His Thr Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys
195 200 205

Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Leu Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
210 215 220

Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val Gln Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Lys
225 230 235 240

His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Lys Pro Gly Ser Glu Thr Ile
245 250 255

Ile Pro Asp Pro Ala Gly Lys Leu Lys Tyr Phe Asp Lys Leu Asn
260 265 270

<210> 9
<211> 981
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> gene
<222> (7) .. (801)
<223> 2-cys Peroxiredoxin

<300>
<308> NM_111995

<400> 9
gcagcaatgg cgtctgttgc ttcttcaact actctcatct cttctccctc ttctagggtt 60
tttccagcaa agtcttcact ttctctcca totgtttctt tccttcgaac cctttcttct 120
ccttccgcat ctgcttctct ccgctccgga ttgctcgac gctcttcct cagctccact 180

tctcgtcggg gcttttgcgtg caaagcccag gccgatgatc ttccactggg tggaacaag	240
gcgcctgatt ttaaggcaga ggctgtgttt gatcaagagt tcatcaaggt taagctctct	300
gattacaatg ggaagaagta tgtgattctc tttttctacc cattggactt tactttcgtc	360
tgcccaacag agattactgc cttcagtgac cggcattcag aatttgagaa gttgaacacc	420
gaagtattag gtgttttctgt cgatagtgtg ttctctcacc ttgcatgggt ccaaacagac	480
aggaaatctg gagggccttg tgatctgaac tatcccctta tttcagatgt cactaaatca	540
atctcaaagt cgttcggagt gctcatccat gatcagggaa tagcactgag aggacttttc	600
ataatcgaca aggaaggagt gatccaacat tccaccatca acaatcttgg tattggccga	660
agcgttgatg agacaatgag aaccctocag gcattacagt acacaggaaa cccggatgaa	720
gtctgcccag caggatggaa gtcgggtgag aagtcaatga aacccgaccc aaaactcagc	780
aaagagtact tctcagctat ttagaaactc tactatgata gcaaaaagggt acaatctttg	840
ttatatgtga gcagagtttt ttttcttgta cgctaaacaa tcctttgttt gattctcact	900
ttgtcccaa aattataata aaaaactttt tccgttgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	981

<210> 10
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1) .. (265)
 <223> 2-cys Peroxiredoxin

<400> 10
 Met Ala Ser Val Ala Ser Ser Thr Thr Leu Ile Ser Ser Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Arg Val Phe Pro Ala Lys Ser Ser Leu Ser Ser Pro Ser Val Ser Phe
 20 25 30
 Leu Arg Thr Leu Ser Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45
 Phe Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ser Ser Thr Ser Arg Arg Ser Phe Ala
 50 55 60

Val Lys Ala Gln Ala Asp Asp Leu Pro Leu Val Gly Asn Lys Ala Pro
65 70 75 80

Asp Phe Lys Ala Glu Ala Val Phe Asp Gln Glu Phe Ile Lys Val Lys
85 90 95

Leu Ser Asp Tyr Asn Gly Lys Lys Tyr Val Ile Leu Phe Phe Tyr Pro
100 105 110

Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Thr Ala Phe Ser Asp
115 120 125

Arg His Ser Glu Phe Glu Lys Leu Asn Thr Glu Val Leu Gly Val Ser
130 135 140

Val Asp Ser Val Phe Ser His Leu Ala Trp Val Gln Thr Asp Arg Lys
145 150 155 160

Ser Gly Gly Leu Gly Asp Leu Asn Tyr Pro Leu Ile Ser Asp Val Thr
165 170 175

Lys Ser Ile Ser Lys Ser Phe Gly Val Leu Ile His Asp Gln Gly Ile
180 185 190

Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Lys Glu Gly Val Ile Gln His
195 200 205

Ser Thr Ile Asn Asn Leu Gly Ile Gly Arg Ser Val Asp Glu Thr Met
210 215 220

Arg Thr Leu Gln Ala Leu Gln Tyr Thr Gly Asn Pro Asp Glu Val Cys
225 230 235 240

Pro Ala Gly Trp Lys Ser Gly Glu Lys Ser Met Lys Pro Asp Pro Lys
245 250 255

Leu Ser Lys Glu Tyr Phe Ser Ala Ile
260 265

<210> 11
<211> 196
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1) .. (196)
<223> Thioredoxin-peroxidase (TPx)

<300>

<308> NP_013684

<400> 11

Met Val Ala Gln Val Gln Lys Gln Ala Pro Thr Phe Lys Lys Thr Ala
1 5 10 15

Val Val Asp Gly Val Phe Asp Glu Val Ser Leu Asp Lys Tyr Lys Gly
20 25 30

Lys Tyr Val Val Leu Ala Phe Ile Pro Leu Ala Phe Thr Phe Val Cys
35 40 45

Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Glu Ala Ala Lys Lys Phe Glu Glu
50 55 60

Gln Gly Ala Gln Val Leu Phe Ala Ser Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Leu Ala Trp Thr Asn Ile Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu Gly Pro Ile
85 90 95

Asn Ile Pro Leu Leu Ala Asp Thr Asn His Ser Leu Ser Arg Asp Tyr
100 105 110

Gly Val Leu Ile Glu Glu Glu Gly Val Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile
115 120 125

Ile Asp Pro Lys Gly Val Ile Arg His Ile Thr Ile Asn Asp Leu Pro
130 135 140

Val Gly Arg Asn Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Glu Ala Phe Gln
145 150 155 160

Trp Thr Asp Lys Asn Gly Thr Val Leu Pro Cys Asn Trp Thr Pro Gly
165 170 175

Ala Ala Thr Ile Lys Pro Thr Val Glu Asp Ser Lys Glu Tyr Phe Glu
180 185 190

Ala Ala Asn Lys
195

<210> 12

<211> 196

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(196)

<223> TPx

<300>

<308> NP_010741

<400> 12

Met Val Ala Glu Val Gln Lys Gln Ala Pro Pro Phe Lys Lys Thr Ala
1 5 10 15

Val Val Asp Gly Ile Phe Glu Glu Ile Ser Leu Glu Lys Tyr Lys Gly
20 25 30

Lys Tyr Val Val Leu Ala Phe Val Pro Leu Ala Phe Ser Phe Val Cys
35 40 45

Pro Thr Glu Ile Val Ala Phe Ser Asp Ala Ala Lys Lys Phe Glu Asp
50 55 60

Gln Gly Ala Gln Val Leu Phe Ala Ser Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Leu Ala Trp Thr Asn Leu Pro Arg Lys Asp Gly Gly Leu Gly Pro Val
85 90 95

Lys Val Pro Leu Leu Ala Asp Lys Asn His Ser Leu Ser Arg Asp Tyr
100 105 110

Gly Val Leu Ile Glu Lys Glu Gly Ile Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile
115 120 125

Ile Asp Pro Lys Gly Ile Ile Arg His Ile Thr Ile Asn Asp Leu Ser
130 135 140

Val Gly Arg Asn Val Asn Glu Ala Leu Arg Leu Val Glu Gly Phe Gln
145 150 155 160

Trp Thr Asp Lys Asn Gly Thr Val Leu Pro Cys Asn Trp Thr Pro Gly
165 170 175

Ala Ala Thr Ile Lys Pro Asp Val Lys Asp Ser Lys Glu Tyr Phe Lys
180 185 190

Asn Ala Asn Asn
195