

# 유전자결손마우스를 이용한 Peroxioredoxins의 생체 내 기능 연구

유대열

한국생명공학연구원 노화연구센터

## Studies on *In Vivo* Function of Peroxioredoxins in Knockout Mice

Dae-Yeul Yu

Aging Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea

Peroxioredoxins (Prxs) are a family of antioxidant proteins that reduce peroxide levels by using reducing agents such as thioredoxin. These proteins were characterized to have a number of cellular functions, including cell proliferation and differentiation and protection of specific proteins from oxidative damage. Thus, it is important to clarify the physiological role of Prxs by generating mouse models deficient in each Prx to better understand the *in vivo* function of Prxs. We have generated and characterized mice deficient in Prx I and II that are abundantly expressed in almost all types of cells. The Prx II<sup>-/-</sup> mice were healthy in appearance and fertile, however showed several pathophysiological disorders. Using the mice, we found that Prx II is an essential antioxidant enzyme that prevents oxidative stress in erythropoiesis, protects against endotoxin-induced lethal shock, regulates platelet-derived growth factor signaling and angiogenesis, inhibits cellular senescence, preserves cognitive function against age-linked hippocampal oxidative damage and exacerbates tumorigenesis in a liver cancer mouse model. The Prx I<sup>-/-</sup> mice were also healthy in appearance and fertile like Prx II<sup>-/-</sup> mice. With the mice, we found that Prx I suppresses K-ras-driven lung tumorigenesis by opposing the redox-sensitive extracellular-signal-regulated kinase/cyclin D1 pathway and plays concerted action with sulfiredoxin in preventing against alcohol-induced oxidative injury in the mouse liver. The results obtained suggest that Prx I and II are essential antioxidant enzymes for maintaining redox homeostasis in mice.

Correspondence to: Dae-Yeul Yu  
우305-806, 대전광역시 유성구 과학로  
125, 한국생명공학연구원 노화연구센터  
Aging Research Center, Korea Research  
Institute of Bioscience and Biotechnology,  
125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon  
305-806, Korea  
Tel: +82-42-860-4422  
Fax: +82-42-860-4609  
E-mail: dyyu10@kribb.re.kr

Received 27 February 2013

Revised 22 April 2013

Accepted 26 April 2013

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Key Words:** Peroxioredoxin; Knockout Mouse; Oxidation-Reduction; Antioxidants

### 서 론

산소원자를 포함하는 화학적 반응성 분자인 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 생물학적으로 매우 중요한 기능을 지니고 있다. 활성산소가 적당히 증가하면 세포증식과 분화를 촉진하지만 과다하게 증가하면 지질, 단백질 그리고 DNA에 산화 손상을 일으켜 결국에는 허혈/재관류(ischemia/reperfusion) 손상, 동맥경화증, 퇴행성신경질환, 암 그리고 알레르기과 같은 수많은 인체질환을 일으키는 데 관여한다[1]. 그러므로 세포는 활성산소의 항상성

을 유지하려고 superoxide dismutases (SOD1, SOD2, SOD3), glutathione peroxidase, peroxiredoxins (Prxs), glutaredoxin, thioredoxin 그리고 catalase와 같은 각종 항산화효소 생산체계를 갖추고 있다[2].

활성산소로는 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 그리고 hydroxyl free radical (HO•)이 있는데, 세포 내 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 전사인자, 인지질분해효소, 인산화효소, 탈인산화효소, 이온 통로와 G protein을 포함하는 다양한 단백질에 영향을 주므로[3], 독성이 없는 농도에서 세포 내 전달자로서의 역할을 한다. 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

를 소거하는 역할을 하는 항산화효소로는 catalase, glutathione peroxidase, 그리고 Prxs가 잘 알려져 있는데, 그 중 Prxs는 낮은 농도의  $H_2O_2$ 를 소거하는 역할을 하므로 세포 내 신호전달조절물질로 연구되고 있다. Prxs는  $H_2O_2$ 와 alkyl hydroperoxides를 각각 물과 알코올로 환원시키는데, 이때 thiol을 함유하는 단백질에 의해 제공되는 환원당량을 이용한다[4-7]. 이들은 모든 종류의 생물체에 homodimer로 존재하며 아미노기 말단 영역에서시스테인 잔기가 보존되어 있고  $H_2O_2$ 에 의해 산화되는 첫 번째 위치이다. 포유동물에는 6가지의 Prx 동형단백질이 확인되어 있고, 또한 3가지 소집단으로 나뉘는데, 2-Cys, atypical 2-Cys, 그리고 1-Cys이다[5]. Prx I, II, III 그리고 IV는 2-Cys Prx 동형단백질로 카르복실기말단에 또 하나의 시스테인이 보존되어 있는 반면, atypical 2-Cys (PrxV)와 1-Cys (Prx VI)는 그렇지 않다. Prx I과 II는 세포질에 존재하고 있고, Prx III는 미토콘드리아에 있으며, Prx IV는 소포체와 세포 외 틈에 존재한다[5]. Prx 효소는 풍부하여 특히 총 수용성단백질의 0.1-0.8%나 되며 그들의 촉매 효율은 10-1,000배로 GPx나 catalase 보다는 못하다. 그러나 Prx I과 II가 다양한 세포에 과발현되어 있을 때, PDGF나 TNF- $\alpha$ 에 의해 자극받아 생산된  $H_2O_2$ 의 세포 내 수준을 낮춰주고 후속 시토카인에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성을 저해하며, 세라미드에 의한 세포사멸의 유도를 봉쇄하였다. 이는 Prx 효소들이  $H_2O_2$ 를 소거함으로써 세포 내 신호전달에 관여한다는 것을 의미한다[8,9].

유전자재조합 기법과 발생공학기법이 접목되어 탄생된 형질전환마우스 생산기법을 이용하여 항산화효소 단백질들의 생체 내 기능연구가 지난 10여 년 전부터 활발히 전개되어, 그 동안 세포수준에서의 단편적인 연구 결과를 개체 수준에서 이해할 수 있게 되었다. 1995년 MnSOD $^{-/-}$ 마우스가 생산되었으나 확장성 심근병증과 간과 골격근육에 지방이 축적되어, 생후 10일도 안되어 죽었다[10]. 또한 1996년에 생산된 MnSOD $^{-/-}$ 마우스는 3주까지 살았지만 신경 퇴행, 심근손상, 그리고 주산기 죽음을 보여[11], 미토콘드리아의 MnSOD가 결손되어 생기는 superoxide가 이러한 표현형을 유도하는 원인임을 알 수 있었다. 그 후 MnSOD가 간에 조건적으로 유전자 적중된 albumin Cre/Mn SOD $^{-/-}$ 마우스가 생산되었으나, 간에 비정상적인 표현형이 뚜렷하게 나타나지 않아[12], MnSOD가 간에서는 생리학적으로 그다지 중요하지 않거나 과잉임을 제시하였다. 반면, CuZn SOD $^{-/-}$ 마우스는 정상적으로 자라지만 축삭의 손상 후 운동신경원(motor neuron)의 손실이 현저하게 일어나는 표현형이 나타나[13], CuZn SOD는 정상적인 운동신경원 발달과 기능에는 필요하지 않지만, 손상을 준 다음 발생하는 생리적인 스트레스 조건 하에서는 필요한 것으로 보인다. 세포 내  $H_2O_2$ 를 소거하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 GPx1가 결손된 마우스는 정상적으로 자랐으며 고산소혈증에 대해 증가되는 감수성을 보이지 않아 마우스의 정상적인 발달 하에서는 GPx 1의 기능이 매우 제한되어

있음을 알 수 있었다[14]. 이후 Prxs에 대한 유전자결손마우스도 본 연구팀을 비롯한 여러 연구실에서 개발되기 시작하였다. 당시 Prxs의 항산화효소 기능에 대해서 많이 연구되어 있지 않았기 때문에, Prxs가 결손된 마우스의 병태생리학적 표현형에 대해 그다지 관심을 두지 않았으나, 본 연구팀은 Prx II 유전자결손마우스를 처음 개발하고, 기능연구를 통해 Prx II가 적혈구의 산소 운반도중 발생하는 산화스트레스를 적절히 제어하여 적혈구의 용혈현상을 방지하고 수명을 유지하는 데 중요한 역할을 함을 밝혔다[15]. 또한 하버드대학 연구팀도 Prdx I (Prx I의 다른 명칭)의 유전자가 결손된 마우스의 연구를 통해 Prx I이 종양 억제인자이고 적혈구 항산화 방어에 중요한 역할을 함을 보고함으로써 Prxs의 세포 내 기능에 대해 더욱 관심을 갖고 연구하게 되었다[16]. 한편 미토콘드리아에 존재하여 중요한 항산화기능을 할 것으로 예상되었던 Prx III의 유전자결손마우스는 세포 내 활성산소 수준이 높게 축적되어 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 폐 손상을 증진시키는 것으로 표현형이 나타나, Prx III는 산화스트레스 하에서 중요한 항산화효소 기능을 지닌 것으로 보고 있다[17]. 또한 Prx III는 태반에서의 항산화 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있고[18], 비만세포의 정상적인 성질을 유지하는 데 중요한 역할을 함이 알려졌다[19].

이상으로 항산화효소 유전자의 결손마우스를 이용하여 항산화효소의 생체 내 기능에 대한 연구를 살펴보았는데 이들 마우스를 이용한 기능연구는 계속 진행되고 있어 항산화효소 유전자결손마우스의 중요성을 다시 한번 확인할 수 있다. 본 종설에서는 이들 모든 연구결과를 다루기에는 지면에 한계가 있어 본 연구팀이 개발한 Prx I 및 II 유전자결손마우스를 이용한 주요 연구결과를 소개하고자 한다.

## 본 론

### 1. Prx II 유전자결손마우스를 이용한 생체 기능연구

본 연구팀은 마우스 Prx II의 유전체 DNA를 클로닝하여 염기서열을 결정하고, 마우스 각 장기조직에서의 Prx II의 발현을 노던블롯분석으로 확인한 결과[20], 모든 장기조직에 Prx II가 과발현되어 있음을 확인하였다. 이 결과는 Prx II가 각 장기를 구성하는 조직 세포에서 생성되는 활성산소를 제어하는 데 관여하는 항산화효소일 가능성을 제시한 것이다. 따라서 마우스의 생체 내에서 Prx II가 어떤 기능을 하는지 연구하기 위해 Prx II 유전자결손마우스를 유전자 적중 방법으로 생산하였다. 즉, Prx II $^{-/-}$ 마우스는 엑손1부터 엑손5를 neo 유전자로 치환한 벡터를 배아줄기세포에 도입하여 제작되었다[15]. Prx II $^{-/-}$ 마우스는 정상적으로 성장하였으며 육안적으로 특별한 이상을 발견하지 못하였으나, 해부한 결과, 비장의 크기가 비정상적으로 비대해진 것을 발견하였다.

## 1) 적혈구 발달 과정에서 Prx II의 역할

Prx II는 적혈구에 존재하는 단백질 중 세 번째로 함량이 많아, Prx II가 결손됨에 따라 Prx II<sup>-/-</sup>마우스의 적혈구는 산화스트레스가 증가되었다. 또한 증가된 산화스트레스에 의해 손상을 받은 적혈구가 비장에 축적됨에 따라 정상적인 적혈구의 생성을 촉진하기 위해 혈중 erythropoietin (EPO) 수준이 8주령부터 급격히 증가하는 현상을 보임으로써[15], Prx II는 적혈구의 수명을 유지하는 데 매우 중요한 역할을 하는 항산화효소임을 규명하였다. 그동안 많은 학자들이 적혈구에서의 산화스트레스 소거에는 GPx가 중요한 역할을 하는 항산화효소일 것으로 생각했지만, GPx 유전자결손마우스에서는 적혈구뿐만 아니라 어느 장기에서도 산화스트레스의 자극이 없는 아무런 병태생리학적 병변이 발견되고 있지 않아, Prx II가 그 역할을 한다는 새로운 사실이 인정받게 되었다. 물론 Prx I 유전자결손마우스가 9개월 이후 심한 용혈현상을 일으켜 Prx I이 적혈구 항산화방어에 중요한 역할을 한다고 보고되었으나[16], 그 결과는 아직도 다른 연구팀에서 입증하지 못하고 있고, 오히려 본 연구팀이 제작한 Prx I<sup>-/-</sup>마우스는 24개월령이 되어도 적혈구 산화스트레스의 마커인 Heinz body의 형성이 대조군과 차이가 없어 [21], 적혈구에서는 Prx II가 중요한 항산화효소임을 알 수 있다. 유전자결손마우스의 표현형은 돌연변이를 어떻게 했느냐에 따라 차이가 나는 경우가 있는데, 본 연구팀이 개발한 마우스는 Prx I 전체 엑손들을 포함하는 DNA를 neo 유전자로 치환하는 방법을 사용하였고, 하버드대학 연구팀은 삽입 돌연변이를 이용하였기 때문에 그러한 차이로 생긴 현상이 아닌가 판단된다.

적혈구 세포는 적혈구 생성과정 중 발생하는 산화스트레스에 손상받기 쉬운데 어떤 항산화효소가 이 과정에서 어떤 작용기전을 거쳐 관여하는지 알려진 바 없어, Prx II<sup>-/-</sup>마우스를 이용하여 연구한 바, Prx II가 DNA 손상을 보호함으로써 정상적인 적혈구 생성을 유지하는 데 관여함을 알게 되었다[22]. 즉, EPO 수준이 거의 동일한 시기인 3주령 Prx II<sup>-/-</sup>마우스에서 대조군에 비해 비정상적인 적혈구 생성을 유도하는 세포사멸과 세포주기 정체가 증가되어 있었으며, 이는 골수에서의 활성산소 증가 및 comet assay에 의한 DNA 손상을 인식하는 DNA 꼬리 길이의 현저한 증가 그리고 관련 분자들의 mRNA 증가를 통해 확인되었다.

산화스트레스에 의한 용혈성 빈혈은 헤모글로빈의 안정성과 관련되어 있으나 그 작용기전은 밝혀진 바 없다. 이에 본 연구팀은 Prx II<sup>-/-</sup>마우스와 thalassemia (THAL) 및 sickle cell anemia (SCA) 환자의 적혈구를 이용하여 활성산소에 의해 유도되는 헤모글로빈 응집을 방지하는 데 Prx II가 참여하는지 그 가능성을 연구하였다. 그 결과, 산화스트레스를 주었을 때, Prx II<sup>-/-</sup>마우스는 대조군에 비해 활성산소 및 Heinz body 형성이 유의성 있게 증가되었고, 결국에는 Prx II<sup>-/-</sup>마우스의 간에 hemosiderin과 heme-oxygenase 1이 축적되었다. 또한 활성산소 의존적인 헤모글로빈 응집은 Prx II<sup>-/-</sup>마우스의

적혈구에 증가되어 있었다. 흥미롭게도 정상마우스의 적혈구에서 Prx II는 헤모글로빈과 결합하고 있었으나, Prx II<sup>-/-</sup>마우스의 적혈구에서는 결합하지 않았으며, THAL 및 SCA 환자의 적혈구에서도 그 결합이 저해되어 있었다[23]. 이러한 결과는 Prx II가 헤모글로빈과 결합하여 산화스트레스에 의한 용혈성빈혈을 보호하는 데 중요한 역할을 하는 것을 의미한다.

## 2) Prx II의 노화 저해 기능

활성산소는 세포노화를 유도하고 노화된 세포는 정상세포에 비해 활성산소 수준이 높은 것으로 알려져 있다[24]. 이에 본 연구팀은 항산화효소인 Prx II가 세포노화에 관여하는지 알아보기 위해 Prx II<sup>-/-</sup>mouse embryonic fibroblast (MEF)와 정상 MEF를 계대 배양하고 senescence-associated (SA)-beta-galactosidase ( $\beta$ -Gal) 염색한 결과, Prx II<sup>-/-</sup>MEF가 정상 MEF보다 약 30% 더 많은  $\beta$ -Gal 양성반응을 보였고, N-Acetyl-L-cysteine (NAC) 처리한 결과,  $\beta$ -Gal 양성반응이 줄어드는 것을 확인하였다. Prx II<sup>-/-</sup>MEF는 정상 MEF에 비해 G2/M이 더 증가되어 있었고, S세포 주기의 세포가 줄어들어 있었으며, p16이 많이 증가되어 있었고, extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 및 p38의 활성이 두드러지게 증가되어 있었다. 한편 Prx II<sup>-/-</sup>마우스의 피부노화를 조사한 결과, Prx II<sup>-/-</sup>마우스는 정상마우스에 비해 표피와 콜라겐을 포함하는 진피가 얇으며 노화 마커인 involucrin과 lorcrin이 높게 발현되어 있었다[25]. 이상의 결과는 Prx II가 세포노화를 보호하는 역할을 함을 시사한다.

한편 활성산소가 정상적인 노화는 물론 노화관련 인지기능저하에도 관여하는 것으로 알려져 있지만 특정 항산화효소에 대한 작용기전은 알려진 바 없었다. 그러므로 본 연구팀은 hippocampus CA1 pyramidal 뉴런에서 노화와 관련된 미토콘드리아 활성산소 생성과 이에 의한 학습 및 기억 손상을 유도하는 세포 내 활성산소를 소거하는 데 Prx II가 관여하는지 조사하였다[26]. 그 결과, 노화 의존적 미토콘드리아활성산소 생성 및 long-term potentiation (LTP) 저하는 정상마우스보다 Prx II<sup>-/-</sup>마우스의 hippocampal neurons에서 더 뚜렷하였으며, Prx II<sup>-/-</sup>마우스는 synaptic plasticity와 관련된 신호전달 경로, 즉, cAMP response element-binding protein (CREB), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 및 ERK를 활성화하는 데 결합이 있었고, 또한 미토콘드리아의 기능적 integrity를 적절히 유지하지 못하였다. 이러한 결과는 Prx II가 노화와 관련된 산화손상에 대한 hippocampal synaptic plasticity 유지하는 것을 도와주는 것으로 보인다.

## 3) PDGF 신호전달 조절 및 혈관 신생에 있어서 Prx II의 기능

Platelet-derived growth factor (PDGF)는 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생산을 통해 다양한 신호전달 단백질들의 티로신인산화를 조절하는 잠재적인 유사분열 및 이주인자이다. Prx II가 PDGF 및 epidermal grow-



th factor (EGF)와 같은 성장인자에 반응하여 생산된  $H_2O_2$ 를 소거하는 과산화효소인 것으로 알려졌지만, 그 작용기전은 거의 알려지지 않았다. 그 작용기전을 이해하기 위해 연구한 결과, Prx II는 PDGF 신호전달의 negative 조절자임이 규명되었다[27]. Prx II의 결손에 의해  $H_2O_2$ 의 생산이 증가되었으며, PDGF수용체와 phospholipase C $\gamma$ 1의 활성이 증가되었고, 이어 PDGF에 반응하여 세포증식과 이주가 증가되었다. 특이하게도 PDGF 자극에 의해 Prx II가 PDGF수용체 주변에 증가되었고, protein tyrosine phosphatase (PTP)의 불활성화를 억제하였다. Prx II는 또한 제1차 배양과 마우스 restenosis 모델에서 PDGF수용체의 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 PDGF 신호전달에 있어서 내재적  $H_2O_2$ 에 대한 Prx II의 국소적 역할을 제시한 것이다. 또한 최근 Prx II는 혈관내피세포에서 vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2의 산화불활성을 보호하는 것으로 밝혀졌다[28], Prx II는 혈관신생에 있어서 중요한 항산화효소로 확인되었다.

한편, Prx II는 동맥경화 발달을 저해하는 것으로 거론되어 왔으나, 이에 대한 아무런 실험적 증거나 작용기전이 밝혀진바 없었다. 이에 Park 등[29]은 apolipoprotein E-결손(ApoE1<sup>-/-</sup>)마우스에서 Prx II가 결손된 마우스를 생산하여 실험한 결과, Prx II의 결손은 ApoE1<sup>-/-</sup>마우스에서의 동맥경화를 더 심화시키는 것을 발견하였다. 이 결과는 Prx II가 혈관면역세포에서의 동맥경화반응을 저해하는 과산화효소임을 의미한다.

#### 4) 그람음성내독소에 의한 염증 반응에서의 Prx II의 기능

활성산소는 각종 세포의 표면 수용체의 활성화에 따라 생산되며 리간드의 수용체 결합을 통한 세포 내 신호전달 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[30-32]. 또한 활성산소는 NF- $\kappa$ B를 활성화하고 toll-like receptor 4 (TLR 4) 신호전달에 있어서 산화스트레스가 관여함이 알려져, 활성산소는 초기 TLR-4 중개된 세포 반응을 통해 NF- $\kappa$ B 의존적인 전사를 조절할 수 있음이 제시됨에 따라[33], Prx II가 내독소 유도된 숙주 반응을 조절하는데 관여하는지 그리고 Prx II가 TLR 4/LPS 중개된 세포활성에 있어서의 활성산소 신호전달에 관여하는지를 알아보기 위해, Prx II<sup>-/-</sup>대식세포(macrophage)와 정상대식세포에 LPS를 처리하였다. 그 결과, 대조군에 비해 Prx II<sup>-/-</sup>대식세포에서 NF- $\kappa$ B와 mitogen-activated protein kinase (MAPK)를 포함하는 염증반응이 현저하게 증가되었고, 이 효과는 활성산소를 생산하는 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 및 p47<sup>phox</sup>의 활성화에 의해 중개되었다. 뿐만 아니라 Prx II<sup>-/-</sup>마우스는 LPS에 의한 치명적인 쇼크에 감수성이 커 생존기간이 크게 줄어들었으나, Prx II viral particles를 주입했을 때 대조군에 가깝게 생존기간이 회복되는 것을 확인하였다[34]. 이러한 결과는 Prx II가 LPS 유도된 염증신호전달의 주요한 negative 조절자임을 제시한 것으로서 Prx II는 내독소 숙주 염증반응을 보호하

는 데 관여하는 항산화효소로 규명되었다.

#### 5) 암발달에 있어서 Prx II의 역할

Prx II는 간암, 유방암, 방광암, 흑색종(melanomas), 그리고 중피종(mesothelioma)에 이상발현되어 있으나[35], 암발달에 있어서 Prx II가 어떤 역할을 하는지 보고된 바 없었다. 본 연구팀은 H-ras<sup>G12V</sup>가 발현하는 간암마우스에서 Prx II가 어떤 역할을 하는지 알아보기 위해, H-ras<sup>G12V</sup>/Prx II<sup>-/-</sup>마우스를 생산하고 H-ras<sup>G12V</sup>마우스와 비교하여 형성된 종양을 관찰한 결과, H-ras<sup>G12V</sup>/Prx II<sup>-/-</sup>마우스는 H-ras<sup>G12V</sup>마우스와 비해 형성된 종양의 크기도 현저하게 작았고 숫자도 적었다. 이는 Prx II가 H-ras<sup>G12V</sup>에 의한 간종양의 발달과 정에서 종양발달을 촉진하는 결과로 판단되어, Prx II가 어떻게 H-ras<sup>G12V</sup>에 의한 종양발달을 촉진하는지 그 작용기전을 연구하고 있다. 한편 최근 Shiota 등[36]은 Prx II가 androgen receptor (AR)의 활성을 조절함으로써 AR-발현하는 방광암 세포의 증식에 관여한다는 결과를 발표하였고, Stresing 등[37]은 폐에 전이된 유방암세포에 Prx II의 발현이 현저하게 증가되어 있었으며, Prx II의 발현을 저하시켰을 때 전이된 유방암세포의 성장이 저해되었다고 보고하였다. 이는 Prx II가 종양발달에 관여한다는 결과로 본 연구팀의 간암에서의 Prx II의 연구결과와 상통하는 것으로 판단된다.

## 2. Prx I 유전자결손마우스를 이용한 연구

Prx I은 Prx II와 91%의 상동성을 지닌 항산화효소로  $H_2O_2$  신호전달에 세포 내 전달자로서 작용하고[8,38],  $H_2O_2$ 에 의해 야기된 세포사멸을 보호하는 작용을 한다[39,40]. 본 연구팀은 마우스에서의 Prx I의 생체 내 역할을 알아보기 위해 Prx I의 전체 엑손을 neo gene으로 치환시켜 Prx I 유전자를 결손시킨 마우스를 제작하여[21], 다음과 같은 연구에 활용하였다.

#### 1) 폐암발달에서의 Prx I의 기능

Prx I은 세포증식과 분화에 관련된 활성산소 작용 반응을 조절하는 항산화효소로[6,41,42], 폐암조직에 과발현되어 있으며[43], 유전자결손마우스 실험에 의해 Prx I은 종양 억제인자로 작용한다는 보고를 중심으로[16], 본 연구팀은 K-ras<sup>G12D</sup>발현 폐암마우스에서의 종양발달에 있어서 Prx I의 역할을 연구하기 위해 K-ras<sup>G12D</sup>/Prx I<sup>-/-</sup>마우스를 생산하였다. K-ras<sup>G12D</sup>/Prx I<sup>-/-</sup>마우스와 K-ras<sup>G12D</sup>마우스의 종양발달과정을 관찰한 결과, K-ras<sup>G12D</sup>/Prx I<sup>-/-</sup>마우스는 K-ras<sup>G12D</sup>마우스에 비해 생성된 종양의 크기가 매우 크고 그 숫자도 많았다. 이는 Prx I이 K-ras<sup>G12D</sup>에 의해 생성되는 폐종양의 발달을 저해하는 기능이 있음을 입증하는 결과이고, 이때 Prx I은 erythroid-related factor 2 (Nrf2) 전사인자의 조절을 받으며 K-ras<sup>G12D</sup>/Prx I<sup>-/-</sup>마우스에서의 Prx I 결손에 의해 증가된 활성산소는 ERK/cyclin D1의 경로를 통한 K-ras<sup>G12D</sup>의 종양형성을 현저하게 촉진하

는 것으로 밝혀졌다[44]. 이 결과는 폐암발달과정 중 발생하는 활성 산소를 Prx I이 어떻게 잘 조절하느냐에 따라 폐암의 발달을 조절할 수 있음을 제시한 것으로 폐암치료를 있어서 활성산소의 조절자가 새로운 치료 표적이 될 수 있음을 알리는 중요한 연구결과이다.

## 2) Sulfiredoxin (Srx)과의 협력 작용

만성적인 알코올 섭취는 각종 활성산소의 생산을 증가시켜 간질환을 야기시키는데, 활성산소가 축적되면, antioxidant-responsive element (ARE)의 활성을 통해 항산화효소들의 발현이 증가하게 된다. 산화스트레스 신호를 ARE로 전달하는 전사인자로는 Nrf2와 activator protein-1 (AP-1)이 있다[45]. 동물에 만성적인 알코올을 투여하거나 간세포에 cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)를 과발현시키면, Nrf2나 AP-1 또는 두 가지 모두의 활성에 의해 SOD와 heme oxygenase-1의 발현이 증가하게 된다. Bae 등[46]은 에탄올 유도에 의해 손상된 간에서 항산화효소의 관여 여부를 조사하였다. 에탄올을 2주간 급여한 마우스의 간에서 Srx가 현저하게 증가되었고, Srx의 발현은 Nrf2 의존적이었다. Srx<sup>+/+</sup>마우스와 Srx<sup>-/-</sup>마우스에 에탄올을 투여하고, 2-Cys Prxs의 hyperoxidation을 조사한 결과, Prx I의 hyperoxidation이 증가되었다. Srx의 결손으로 인한 손상이 Prx I의 hyperoxidation을 가져왔다는 결과를 전제로, Prx I<sup>+/+</sup>마우스에 에탄올을 유도시켜 발생한 간손상에서, Prx I의 역할을 4-Hydroxynonenal (4-HNE)과 3-nitrotyrosine (3-NT)의 면역염색을 통해 조사하였다. 에탄올 유도된 간손상을 알기 위해서는 carbonylation 같은 단백질의 modification, 4-HNE adducts의 형성과 tyrosine의 nitration를 검사하는데[47], 실험 결과, 에탄올 유도된 간손상이 Prx I<sup>+/+</sup>마우스보다 Prx I<sup>-/-</sup>마우스에 더 심각한 것을 4-HNE와 3-NT의 면역염색을 통해 발견하였다. 이러한 결과는 만성 알코올 유도된 간손상을 극복하기 위해 Srx와 Prx I이 상호작용하는 것을 의미한다.

## 결 론

활성산소는 생물학적 기능 연구는 물론 염증, 암, 퇴행성신경질환 등의 병변발생에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 인간 같은 포유동물에는 이러한 활성산소를 소거하여 세포의 산화환원항상성을 유지하기 위해 다양한 항산화효소체계가 잘 갖추어져 있다. Prxs는 항산화효소 중 가장 최근에 알려진 항산화효소이나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 소거하여 신호전달경로를 조절하는 기능을 갖고 있어 많은 연구가 이루어져 왔고 앞으로도 더 많은 연구가 진행될 것으로 기대된다. 그 동안 Prx I, II, III의 유전자결손마우스가 제작되어 Prxs가 암, 염증, 퇴행성신경질환, 용혈성빈혈, 노화 등 각종 만성질환과 관련이 있음이 확인되었다. 한편, 생체 내 각 장기의 세포에서 생성되는 활성산소를 소거하는 데 항산화효소의 작용이 세포 내 산화환원반응의 환경에 따라 다른 것이 알려지고 있어 각 항

산화효소의 역할은 특징이 있을 것으로 판단된다. 하지만 아직도 유전자결손마우스가 제작되지 않은 항산화효소가 있어 이들 마우스 제작이 필요하고 이들 항산화효소 유전자결손마우스를 이용하여 보다 자세한 생체 내 기능연구가 필요하다고 생각한다.

미국, 유럽, 중국, 일본, 그리고 최근 우리나라가 가입한 International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)에서는 향후 5년 이내 Knockout Mouse Program (KOMP)에서 제작한 유전자 적중된 배아줄기세포를 이용하여 약 5,000종의 유전자결손마우스를 생산하고 표현형을 분석하여 그 결과를 공개함으로써, 모든 연구자들이 자유롭게 마우스와 표현형 데이터를 사용할 수 있도록 하고 있어[48], 그동안 제작하지 않았던 항산화효소에 대한 유전자결손마우스도 이 기회를 통해 만들 수 있을 것으로 기대된다.

최근 암생물학에 있어서 암줄기세포의 역할이 중요한 연구테마로 떠오르고 있다. 항암제나 방사선 치료 후 암세포는 일시적으로 죽어가지만 계속적인 치료 후 내성이 생긴 암세포는 더욱 악성으로 발전되어 결국에는 귀중한 생명을 잃게 되므로 내성암을 어떻게 적절히 치료하거나 다스리느냐가 생명을 유지할 수 있는 관건이 되고 있다. 암줄기세포는 배아 및 성체줄기세포와 같이 자가증식 및 분화 기능이 있어 기존의 배아 및 성체줄기세포와 성격이 매우 유사한 것으로 알려지고 있다. 암줄기세포는 활성산소 수준이 낮고 G0 세포 주기 상태를 유지하고 있으며 세포사멸도 저하된 수준으로 존재하기 때문에 항산화효소 시스템이 잘 발달되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 각 종 암줄기세포의 산화환원 정도의 유지에 있어서 어떤 항산화효소가 관여하는지 밝히는 것은 암줄기세포 내 산화환원현상을 이해할 뿐만 아니라 항산화효소 또는 그 조절인자의 적절한 조절을 통해 암치료 효과를 증진시키는 데 유용한 연구 결과가 될 것으로 사료된다.

이상으로 살펴본 바와 같이 항산화효소 유전자결손마우스는 각종 항산화효소의 생체 내 기능을 규명하는 데 활용되어 *in vitro* 세포 실험을 통해 알 수 없었던 새로운 지견을 많이 얻었다고 생각한다. 앞으로도 이들 마우스를 이용하여 새로운 분야에서 각각의 항산화효소의 역할이 계속 밝혀질 것이며, 이들 결과는 항산화효소의 생체 내 기능 규명은 물론 질병치료를 위한 정보를 제공할 것으로 의심치 않는다.

## REFERENCES

1. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999;32:595-603.
2. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nat Rev Drug Discov 2009;8:579-91.
3. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. Curr Opin Cell Biol 2005;17:183-9.

4. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7017-21.
5. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001;52:35-41.
6. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347-64.
7. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003;28:32-40.
8. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 1998;273:6297-302.
9. Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* 1997;272:30615-8.
10. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376-81.
11. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9782-7.
12. Ikegami T, Suzuki Y, Shimizu T, Isono K, Koseki H, Shirasawa T. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:729-36.
13. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13:43-7.
14. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997;272:16644-51.
15. Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 2003;101:5033-8.
16. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003;424:561-5.
17. Li L, Shoji W, Takano H, Nishimura N, Aoki Y, Takahashi R, et al. Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:715-21.
18. Li L, Shoji W, Oshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N. Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice. *FEBS Lett* 2008;582:2431-4.
19. Huh JY, Kim Y, Jeong J, Park J, Kim I, Huh KH, et al. Peroxiredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:229-43.
20. Lim MJ, Chae HZ, Rhee SG, Yu DY, Lee KK, Yeom YI. The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene* 1998;216:197-205.
21. Han YH, Kwon T, Kim SU, Ha HL, Lee TH, Kim JM, et al. Peroxiredoxin I deficiency attenuates phagocytic capacity of macrophage in clearance of the red blood cells damaged by oxidative stress. *BMB Rep* 2012;45:560-4.
22. Kwon TH, Han YH, Hong SG, Lee DJ, Ha HL, Kang SW, et al. Reactive oxygen species mediated DNA damage is essential for abnormal erythropoiesis in peroxiredoxin II(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;424:189-95.
23. Han YH, Kim SU, Kwon TH, Lee DS, Ha HL, Park DS, et al. Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;426:427-32.
24. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, et al. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* 2002;21:2180-8.
25. Han YH, Kim HS, Kim JM, Kim SK, Yu DY, Moon EY. Inhibitory role of peroxiredoxin II (Prx II) on cellular senescence. *FEBS Lett* 2005;579:4897-902.
26. Kim SU, Jin MH, Kim YS, Lee SH, Cho YS, Cho KJ, et al. Peroxiredoxin II preserves cognitive function against age-linked hippocampal oxidative damage. *Neurobiol Aging* 2011;32:1054-68.
27. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 2005;435:347-53.
28. Kang DH, Lee DJ, Lee KW, Park YS, Lee JY, Lee SH, et al. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells. *Mol Cell* 2011;44:545-58.
29. Park JG, Yoo JY, Jeong SJ, Choi JH, Lee MR, Lee MN, et al. Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2011;109:739-49.
30. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000;2000:pe1.
31. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 2003;111:769-78.
32. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S211-5.
33. Aeshnounge K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 2004;172:2522-9.
34. Yang CS, Lee DS, Song CH, An SJ, Li S, Kim JM, et al. Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. *J Exp Med* 2007;204:583-94.
35. Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett* 2009;286:154-60.
36. Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Takeuchi A, Fujimoto N, Uchiumi T, et al. Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2011;51:78-87.
37. Stresing V, Baltziskueta E, Rubio N, Blanco J, Arriba M, Valls J, et al. Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene* 2013;32:724-35.
38. Neumann CA, Cao J, Manevich Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 2009;8:4072-8.
39. Kim SU, Hwang CN, Sun HN, Jin MH, Han YH, Lee H, et al. Peroxiredoxin I is an indicator of microglia activation and protects against hydrogen peroxide-mediated microglial death. *Biol Pharm Bull* 2008;31:820-5.
40. Bae JY, Ahn SJ, Han W, Noh DY. Peroxiredoxin I and II inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in MCF-7 cell lines. *J Cell Biochem* 2007;101:1038-45.
41. Butterfield LH, Merino A, Golub SH, Shau H. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid*

- Redox Signal 1999;1:385-402.
42. Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002;7:123-30.
43. Park JH, Kim YS, Lee HL, Shim JY, Lee KS, Oh YJ, et al. Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology* 2006;11:269-75.
44. Park YH, Kim SU, Lee BK, Kim HS, Song IS, Shin HJ, et al. Prx I suppresses K-ras-driven lung tumorigenesis by opposing redox-sensitive ERK/cyclin D1 pathway. *Antioxid Redox Signal* 2012.
45. Soriano FX, Baxter P, Murray LM, Sporn MB, Gillingwater TH, Hardingham GE. Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Mol Cells* 2009;27:279-82.
46. Bae SH, Sung SH, Cho EJ, Lee SK, Lee HE, Woo HA, et al. Concerted action of sulfiredoxin and peroxiredoxin I protects against alcohol-induced oxidative injury in mouse liver. *Hepatology* 2011;53:945-53.
47. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006;43:S63-74.
48. Seong JK, editor. DASAN 2012 Conference for Mouse Phenogenomics; 2012 Sep 23-25; Seogwipo, Jeju, Korea