

## 초고온 Archaeon인 *Thermococcus profundus*로부터 Thermosome 유사 단백질의 분리 및 구조 분석

김숙경, 이미홍, 박성철, 정강원\*  
경상대학교 자연과학대학 생명과학부 생화학과

### Thermosome-like Protein from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus*; Purification and Structural Analysis

Suk Kyoung Kim, Mi-Hong Lee, Seong-Cheol Park and Gang-Won Cheong\*  
Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea  
(Received December 8, 2000)

#### ABSTRACT

We have isolated a large cylindrical protein complex from hyperthermophile archaeon *Thermococcus profundus*. Structural analysis by image processing of electron micrographs suggests that the complex is composed of two stacked rings of eight subunits each; the ring enclose a central channel. The purified protein was shown to be a homomultimer of 60 kDa subunit (P60 complex). It exhibits an extremely thermostable ATPase activity with a temperature optimum of 80°C. This protein complex may play an important role in the adaptation of thermophile archaeon to life at high temperature.

**Key words** : Electron microscopy, Heat stable, Hyperthermophile archaeon, Image processing, Thermosome

#### 서 론

생물체는 외부로부터 열이나 스트레스를 받았을 때 heat shock protein (HSP)이라는 세포단백질 (cellular protein)의 발현을 증가시킨다. 이러한 HSP들은 스트레스로 인해 손상된 폴리펩티드의 재생 (refolding)을 위한 molecular chaperone으로서의 기능이나, 손상된 비정상 단백질을 감성분해 (degradation)시키는 protease

의 기능을 가지는 것으로 나누어진다 (Goldberg, 1992; Parsell & Lindquist, 1993; Hayes & Dice, 1996).

Molecular chaperone은 크게 HSP70 family와 chaperonin family로 나누어진다. Chaperonin은 큰 분자량의 단백질 복합체로써 전자현미경상으로 두 개의 링모양이 겹쳐진 형태로 보이며, 생물체에 따라 14~18개의 동일하거나 비슷한 60 kDa의 단백질로 이루어진다. Chaperonin family는 다시 세부적으로 group I, II로 구별된다. Group I은 미생물과 mitochondria,

\* Correspondence should be addressed to Dr. Gang-Won Cheong, Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea. Ph.: (055) 751-5962, FAX: (055) 752-7062, E-mail: gwcheong@nongae.gsnu.ac.kr  
Copyright © 2000 Korean Society of Electron Microscopy

chloroplast에 존재하며 GroEL 등이 여기에 속한다. Group II chaperonin은 진핵세포의 세포질이나 archaeon에서 존재하며 TRiC/CCT, TF55, thermosome이 지금까지 분리되고 있다. 단백질의 assembly와 folding을 도와주는 molecular chaperonin은 1979년 Hendrix에 의해 HSP60 계열인 두 형태의 oligomeric protein 즉 60 kDa GroEL과 10 kDa GroES를 대장균에서 분리하면서 시작되었다. HSP 60 계열의 단백질은 다양한 기질의 특이성을 갖고 있으며, 특히 X-ray와 전자현미경의 단백질의 구조 연구의 결합으로 구조와 기작의 작용에 대해 많은 것을 이해하게 되었다. 특히 전자현미경/영상처리(image processing), 돌연변이(mutation)와 생화학적 실험으로 비정상 단백질이 cylinder형태 GroEL의 안쪽 면에서 소수성 결합으로 안정화된다는 사실이 밝혀진 후, 재생기작(refolding mechanism)에 대한 비밀 접근에 한 걸음 나아가게 되었다. 최근 전자현미경/영상처리를 이용하여 GroEL과 GroEL-GroES complex구조와 GroES/ATP나 ATP의 존재 하에서 재생됨을 밝혀주는 명확한 증거가 되었다. HSP60계통의 다른 계열 즉 Group II인 thermosome, TRiC/CCT의 경우 group I(GroEL)에서 GroES와 같은 co-chaperone에 해당하는 것은 없고, 16단량체의 복합체(GroEL: 14단량체의 복합체)를 형성함이 보고되었다. Thermosome은 1991년에 초고온 생물체인 *Pyrodictium occultum*에 열 충격을 주었을 때 생성되는 거대분자 ATPase complex로써 발견되었다(Phipps et al., 1991). 생화학적 그리고 전자현미경 데이터에 기초해서 그것은 새로운 타입의 chaperonin으로 밝혀졌으며, GroEL과 구별하기 위해 group II chaperonin라 정의되었다.

Hyperthermophilic archaea는 항상 높은 온도에 노출되어 생존하기 때문에 어떻게 단백질들이 안정화 상태로 존재할 수 있는지에 많은 관심이 생겼으며, 많은 양의 HSP가 존재할 것이라 생각되어지고 있다. 실제로 *Sulfolobus*라는 archaea는 HSP의 일종인 thermosome만 총단백질중 매우 많은 양이 발견되어 세포 내에서 주된 HSP로 존재한다는 것이 밝혀졌고 열에 노출시 대부분의 세포질내 단백질들이 급격히 사라지는 반면에 오히려 thermosome은 확연히 증가한다는 사실이 보고되고 있다(Trent et al., 1990). 이러

한 HSP는 hyperthermophile의 열에 대한 안정성에 중요한 역할을 할 것이라 생각되었고 이러한 이유로 80°C에서 성장하는 *Thermococcus profundus*에서 거대분자 HSP를 분리하고 구조를 밝히고자 한다.

본 연구에서는 초고온 archaeon인 *Thermococcus profundus*로부터 thermosome과 유사한 단백질 복합체를 분리하여 생화학적 특성과 온도 변화에 따른 활성의 조사, cryoelectron microscopy와 image processing 등을 이용하여 구조를 규명하므로써 thermosome의 기작을 이해하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. *Thermococcus profundus*의 배양

*Thermococcus profundus*는 Kobayashi et al. (1994)의 방법에 따라 혐기적으로 80°C에서 배양하였다. 배양된 균은 원심분리로 농축 후 -70°C에서 보관하였다.

### 2. P60 complex의 분리

*T. profundus*를 50 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.5)으로 두 번 씻은 후(1,000 × g, 30 min), DNase II(Sigma, 1 mg/100 ml 완충용액)을 첨가 후 실온에서 10분간 항온 시켰다. Sonication을 이용하여 균을 분쇄시켰으며, 원심 분리를 이용하여 부서지지 않은 균을 분리시켰다. 상등액을 50 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.5)으로 평형된 High Q Sepharose column(Parmacia, Germany)에 통과시킨 후, NaCl linear gradient(0~500 mM)로 분리하였다. P60 complex는 220~400 mM NaCl에 농도에서 나타났으며, 농축 후 Sephacryl S-400(Pharmacia, Germany)으로 gel filtration을 하였다. 순수 분리한 P60 complex는 50 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.5, 50 mM NaCl)로 혼탁시킨 후 -20°C에 보관하였다. 순수 분리한 P60 complex의 분리과정은 전기영동과 전자현미경으로 각각 확인하며 진행하였다.

### 3. ATPase 활성

P60 complex의 ATPase 활성은 변형된 malachite green assay방법(Andrä et al., 1998)에 따라 ATP로부터 Pi

가 방출되는 양을 측정하였다. 1 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl을 포함하는 20 mM Mops (pH 7.5 at 80°C) 완충용액에 10 µg P60 complex를 첨가해 100 µl의 표준용액을 만들고 정해진 온도(70~100°C)에서 1시간동안 항온시켰다. 표준 용액은 0°C에서 식힌 후 800 µl malachite green reagent와 100 µl 34% trisodium citrate를 첨가했다. 상온에서 45분 동안 둔 후 반응용액은 흡광도 660 nm에서 측정되었다. 방출된 Pi의 양을 계산하기 위해 표준곡선(0~30 nmol P)을 만들었다. 모든 결과는 실험 상태에서 자발적으로 일어난 ATP hydrolysis를 보정한 것이다.

#### 4. 열 안정성 실험

P60 complex의 열 안정성에 대해 실험하기 위해 먼저 ATP가 없는 반응용액을 지시된 온도(80~110°C)에서 항온 시켰다. 시간에 따라 반응용액은 제거되고 4°C에서 식힌 후, ATP를 첨가해 80°C에서 1시간동안 항온 시켜 ATPase 활성을 측정하였다.

#### 5. 전자 현미경과 영상처리

순수 분리한 P60 complex는 Cheong et al. (1993)의 방법에 따라 염색하였다. 간단히 요약하면, 탄소 막을 입힌 grid에 3분 동안 흡착시킨 후 여과지로 조심스럽게 상등 액을 제거후 증류수로 2~3회 씻은 다음 2% uranyl acetate로 착색시켰다. Tecnai 12 전자현미경으로 120 kV에서 37,000×의 배율로 Low-Does System을 이용하여 촬영하였으며, Kodak 4489 Film에 기록하였다. Optical diffractometer를 이용하여 인화된 전자현미경 사진에 나타난 난시현상(astigmatism)과 drift 현상들을 관찰하였으며 영상 분석과 처리를 위해 적절한 사진을 선택하였다.

전자현미경사진을 Leafscan (LS45, USA)을 사용하여 1024×1024 pixel을 20 µm pixel 크기(실제 object에 대해 0.48 nm)로 계수화(digitalize)시켰다. 영상분석과 처리는 EM (Hergel, 1996)과 SEMPER (Saxton et al, 1979) 등의 software package를 이용하였다. 계수화된 전자현미경 image를 64×64 pixel의 크기로 각각의 입자(P60 complex)를 자른 후 Kim et al. (1999)의 방법에 따라 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. 임의로 선택된 영상을 레퍼런스로 사용하여

correlation average (Phipps et al., 1991)를 구하였다. 이 결과로 얻은 평균을 다음 cycle의 레퍼런스로 사용하여 평균을 구하였다. 또 multivariation statistical 분석법 (Frank, 1996) 즉, 모든 영상을 각각 비교하여 얻은 eigenvector와 eigenvalue값을 이용하여 유사한 형태로 분류(classification)하였다. 이와 같은 방법으로 얻은 class의 평균과 모든 입자의 평균은 angular correlation coefficients (Dürr, 1991)에 기초로 symmetry를 결정하였다.

#### 6. 극저온 전자현미경

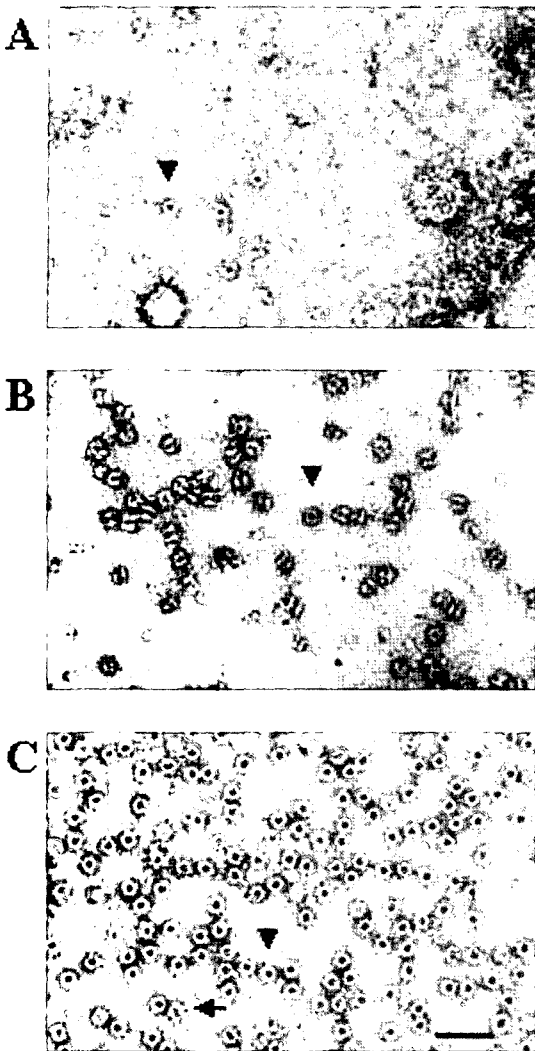
미세 구조의 변형됨없이 관찰하기 위해서 극저온 전자현미경(cryoelectron microscopy)를 이용하였으며, amorphous ice를 얻기 위해 Cheong et al. (1996)의 방법에 따라 hole grid와 냉매로 ethane slash을 이용하였다. 50 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.5 50 mM NaCl)에 농축된 P60 complex 6 µl를 holey carbon grid에 적용시킨 후 filter-paper로 blotting하자마자 빠르게 ethane slash에 급속냉동시켰다. 액체 질소에 보관된 급속냉동된 시료는 공기와의 접촉없이, 온도의 변화없이 cryotransfer holder (Gatan, USA)을 이용하여 전자현미경으로 옮겼다. Tecnai 12 전자현미경으로 120 kV에서 37,000×의 배율로 촬영하였으며, 이미지는 1,024×1,024 pixel slow scan CCD (charge-coupled device) 카메라에 기록하였다. 카메라의 pixel size는 14 µm(실제 specimen에 대해 0.3 nm)이며 모든 이미지는 Low-Does system으로 촬영되었다.

### 결과 및 고찰

#### 1. P60 complex의 분리

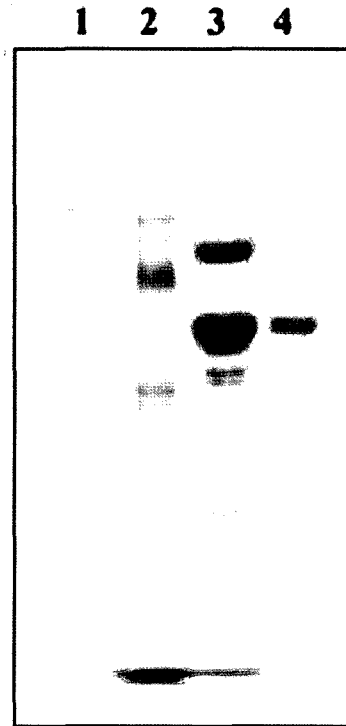
P60 complex의 분리 모든 과정을 전자현미경으로 확인하면서 진행하였다.

*T. profundus*의 총단백질에 대한 전자현미경사진(Fig. 1-A)에서 링(ring) 모양의 단백질 복합체(protein complex)를 관찰할 수 있었다. 이 복합체는 anion-exchange chromatography와 gel filtration을 이용하여 분리하였다. 총단백질을 High Q column에 통과시킨 후 모든 peak의 분획을 SDS-전기영동과 전자현



**Fig. 1.** Electron microscopy of purification step (A) Micrograph of cell extracts released from *T. profundus*. (B) P60 complex containing fraction obtained from anion exchange chromatography. (C) Purified P60 complex obtained after gel filtration chromatography. The arrow and arrowhead indicates a representation of side-on view and top-on view of P60 complex, respectively. The scale bar represents 50 nm. The electron micrographs were obtained by negative staining of proteins with 2% uranyl acetate as described in Material and Methods.

미경으로 확인하였다(data not shown). 220~400 mM NaCl 농도에서 나타난 peak에서 group II chaperonin에 속하는 thermosome과 유사한 단백질 복합체를 전

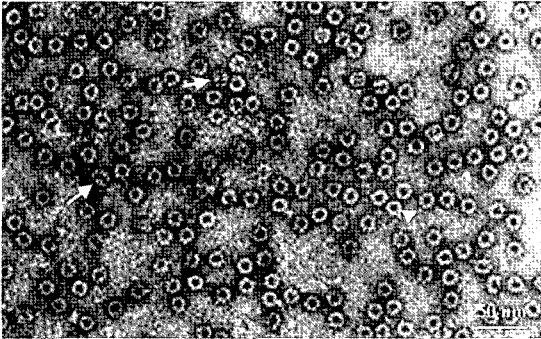


**Fig. 2.** SDS-PAGE (10% acrylamide) of pooled P60 complex at different stages of purification. Lane 1: molecular size standards (212 kDa; 116 kDa; 97.4 kDa; 66.2 kDa; 57.5 kDa; 40 kDa) Lane 2: cell extracts. Lane 3: P60 complex containing fraction eluting at 220 to 400 mM NaCl gradient. Lane 4: Pooled fraction from Sephacryl S-400 gel filtration. Gel was stained with Coomassie blue R-250.

자현미경 사진(Fig. 1-B)에서 관찰할 수 있다. 또한 SDS-전기영동(Fig. 2)한 gel에서 가장 뚜렷이 보이며, 100kDa 근방에 강한 band와 많은 약한 band를 보여주고 있다. 순수분리하기 위해 Sephacryl S-400을 통과시켰으며, 각 peak에 대해 전자현미경과 SDS-전기영동으로 확인하였다(data not shown). 그 결과 void volumn 직후에 나타난 peak에서 thermosome과 유사한 단백질 복합체만을 관찰할 수 있었고(Fig. 1-C), SDS-전기영동으로 확인 결과 60 kDa 근방에서 하나의 band를 보여주고 있다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 이 복합체의 monomer는 60 kDa protein (P60 complex)임을 알 수 있었다.

## 2. P60 complex의 구조

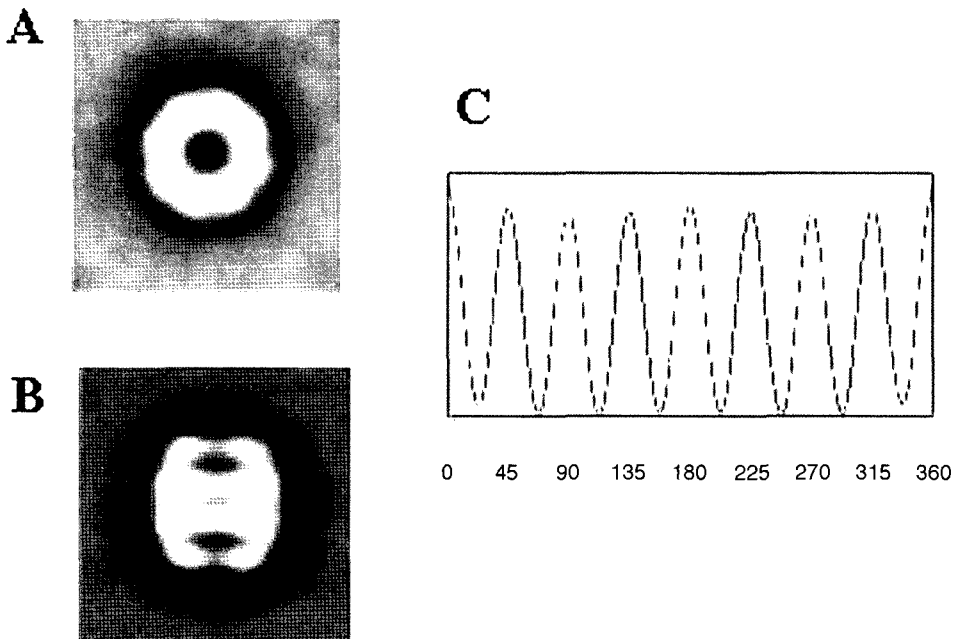
순수 분리한 P60 complex의 구조를 규명하기 위하여 투과전자현미경과 영상처리를 이용하였다. P60



**Fig. 3.** Electron micrograph of negatively stained P60 complex. The electron micrograph of P60 complex showed two different views, ring shaped (top-on view; arrowhead) and striated structures (side-on view; arrow) depending on orientation on grid.

complex를 2% uranyl acetate로 착색하여 관찰한 전자현미경 사진은 두 가지 형태, 즉 링 형태 (end-on view)와 사다리 형태 (side-on view)를 보여주고 있다 (Fig. 3). 이것은 P60 complex가 grid위에 놓여진 상태에 따라 end-on view와 side-on view의 형태를 보여주고 있는 것이다. End-on view는 전자현미경 사진에서도 뚜렷하게 8개의 subunit으로 이루어진 링모양으로 보이며, 중앙에 염색제로 채워진 hole이 있음을 알 수 있다. Side-on view는 4개의 줄무늬로 이루어진 실린더 형태를 나타낸다.

Top-on view의 영상처리를 위해 862개의 입자들을 선별하여 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. 862개 입자들의 data set에서 얻은 eigenvector/eigenvalue의 기초로 분석 및 correlation average를 구하였다. 가장 많은 information을 포함한 3개의 eigenvector를 이용하여 유사한 형태별로 구분 (classification) 즉 2개의 class로 나누었다. Symmetry를 시키지 않은 각 class average들에서 8-fold symmetry를 뚜렷이 가



**Fig. 4.** Correlation averages of P60 complex. (A) Correlation averages of end-on views after symmetrization. The diameter of ring and the central hole are 15 nm, 5 nm, respectively. (B) Average of side-on views after symmetrization. The maximum width and height of the average are 15 nm and 16.5 nm, respectively. (C) The graph of angular correlation coefficient of average of 862 complex with end-on orientation is consistent with eight-fold symmetry.

지고 있음을 보여주고 있다. 또한 class간의 구조적 차이가 크게 없음을 보여주고 있다(data not shown). P60 complex는 hole을(약 5 nm)가지고 있으며, 이를 중심으로 단백질이 모여 링모양을 이룬다. 전체적인 크기는 15.5 nm이다(Fig. 4-A). Fig. 4-C는 symmetry 시키지 않은 862개 particle의 average에 대한 angular correlation coefficient average graph를 나타내었으며,

이는 45°마다 하나의 peak가 반복되어 8-fold symmetry라는 것을 알 수 있다. Side-on view의 영상처리를 위해 218개의 입자들을 선별하여 역시 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. Correlation average는 실린더 모양을 보여주며, 크기는  $16.5 \times 14.8$  nm이다(Fig. 4-B). Complex는 중앙 수평면의 중심으로 위, 아래에 균등한 mass를 보여주며, 중앙을

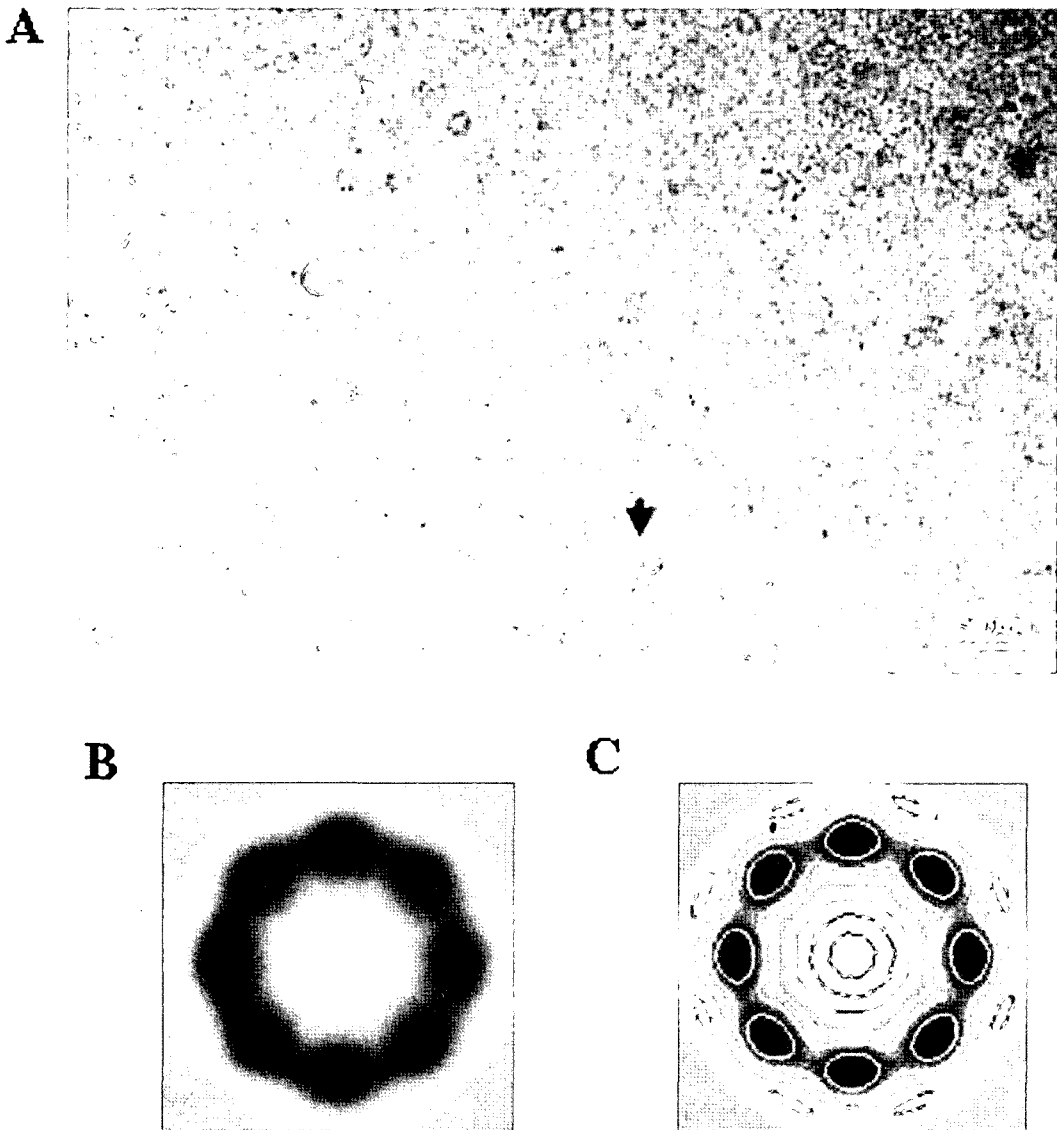


Fig. 5. Electron micrograph and average of P60 complex embedded in vitreous ice. The contrast of the unstained images was reversed. The scale bar represents 50 nm.

중심으로 많은 mass를 가지는 두 개의 층과 바깥으로 적은 mass를 가지는 두 개의 층을 보여준다. 또한 complex의 바깥쪽으로 같은 크기의 cavity를 가지고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 결과로 P60 complex는 8개의 입자를 가지는 ring이 두 개 겹쳐진 16개의 subunit으로 구성되어 있음을 추정할 수 있다. 이러한 형태는 지금까지 규명된 group II chaperonine 중 thermosome의 구조와 매우 유사함을 알 수 있다. Group II chaperonine은 archaeon과 진핵생물의 cytosol에 존재하며 세포가 열이나 스트레스를 받아 변성된 단백질들을 내부의 hole에서 다시 활성화시키는 역할을 하는 거대분자의 단백질로 링모양의 end-on view와 실린더 형태의 side-on view로 존재하는 것이 밝혀졌다. *T. profundus*에서 분리된 P60 complex가 thermosome과 같이 molecular chaperone으로써의 역할을 수행한다면, side-on view에서 보여주고 있는 cavity에서 단백질을 refolding 시킬 것이다. Chaperone으로 가장 잘 알려진 GroEL은 그의 기능을 수행하기 위해서 co-chaperone인 GroES가 필요하다. P60 complex의 경우 co-chaperone이 필요하지 않으며 chaperone으로 기능이 수행될 때 ATP 등이 요구되며, 이들에 의해 공간적 배열이 재구성됨으로써 그의 기능을 수행할 공간을 형성할 것으로 추정된다.

### 3. 극저온 전자현미경과 구조규명

단백질을 음착색함으로써 관찰하는 방법은 매우 빠르며 간편한 방법이다. 이것은 훌륭한 지지체를 제공하며 시료를 radiation으로부터 보호하는 역할을 한다. 그러나 단백질의 구조를 규명하는데 있어서 탈수를 방지하며 지지체에 얽힘으로써 생기는 찌그러짐을 막아주어 보다 native한 상태를 유지하는 것이 중요하다(Steinbrecht, 1987). 극저온 전자현미경은 시료를 vitreous ice에 고정시킴으로써 전자현미경속 고진공에서도 시료의 탈수 현상을 막을 수 있을 뿐만 아니라 holey grid에 embedding됨으로써 찌그러짐을 방지하는 매우 유용한 방법이다.

변형되지 않은 상태 즉 hydrated된 P60 complex의 구조를 규명하기 위해 시료는 vitreous ice에 embedding시켜  $-170^{\circ}\text{C}$ 를 유지하며 전자현미경으로 관찰하였다. P60 complex의 극저온 전자현미경 사진은

Fig. 6에서 보여주고 있으며, 입자의 내부에 cavity를 가지는 링모양을 나타내고 있으며 음착색된 입자와는 이미지의 음양이 반대로 보여주고 있다(Fig. 5-A)

음착색된 P60 complex와 hydration P60 complex의 두 구조를 비교해 보면, 두 구조 모두 링모양을 나타내며 내부에 hole이 존재한다는 것을 알 수 있으며 전체적 이미지는 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 그러나 end-on view의 전체 크기와 hole크기에서 차이를 보였다. 음착색된 P60 complex의 이미지의 전체 크기가 hydration 이미지보다 1 nm 컷으며 내부의 cavity크기는 hydration P60 complex가 3 nm 컷다. 음착색된 P60 complex의 이미지는 탈수 상태이고, grid의 carbon지지체에 의해 찌그러져 전체 크기가 퍼지며 그

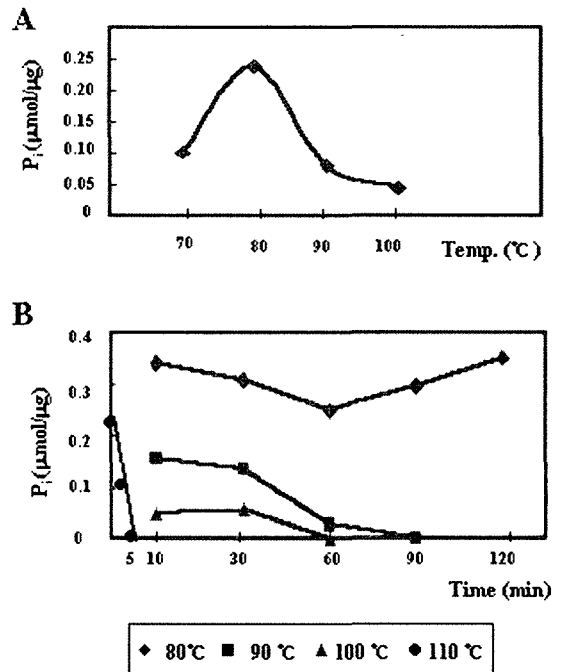


Fig. 6. Temperature dependence and thermal stability of P60 complex. (A) ATPase activity of the P60 complex incubated for 1 hr at different temperature are shown. All presented data were corrected for spontaneous ATP hydrolysis under the tested conditions. (B) Thermostability of the P60 complex. Samples containing no ATP were preincubated at different temperatures for various periods of time in ATPase assay buffer. ATPase activity was then assayed by adding ATP and incubating at  $80^{\circ}\text{C}$  for 1 hr.

에 따라서 내부 cavity도 줄어들었음을 추측할 수 있다.

#### 4. P60 complex의 ATPase 활성과 열 안정성

순수 분리된 P60 complex의 ATPase 활성은 80°C에서 최고의 활성을 나타내며 70~100°C까지 활성을 보인다(Fig. 6-A). 높은 온도에서 ATPase assay를 할 때 증가되는 온도에 비례하여 자발적인 ATP hydrolysis가 일어나며 이러한 점을 보완하기 위해 P60 complex가 제거된 반응용액을 온도에 따라 hydrolysis를 실험하여 ATPase 활성 결과로부터 보정하였다. P60 complex의 온도에 따른 ATPase 활성 변화의 이유를 이해하기 위해 우리는 지시된 온도(80~110°C)에서 지정된 시간에 따라 ATP없이 먼저 열을 가한 후 그것의 남아있는 ATPase 활성을 측정하였다. Fig. 6-B에서 보여지는 것처럼 이 단백질, 즉 효소는 매우 높은 열 안정성을 보이며 80°C에서는 120분 동안 열을

가한 후에도 활성도가 감소되지 않았다. 심지어 90°C와 100°C에서는 각각 60분과 30분 동안 열을 가한 후에도 여전히 활성도가 살아있음을 알 수 있었다. 온도를 110°C까지 올렸을 때 P60 complex는 5분만에 완전하게 불활성되었다. 이러한 결과로부터 우리는 80°C 이상에서의 P60 complex의 점차적인 활성도 감소는 열에 의한 것임을 알 수 있었다. 불활성상태의 P60 complex의 구조를 실험하기 위해 전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 7). 90°C에서의 불활성상태의 P60 complex는 control에 비해 매우 적은 양의 fine structure가 보이며 군데군데 뭉쳐있음을 볼 수 있다. 또한 100°C와 110°C에서의 불활성상태의 단백질은 매우 심하게 뭉쳐져 원래의 구조를 찾아볼 수 없었다. 이와 같은 결과로 *T. profundus*에서 분리된 thermosome 유사 단백질(P60 complex)은 열에 매우 안정한 효소임을 알 수 있으며, 내부의 구조와 기작 등을 이해하기 위해서 cryo-tomography적 고찰이 필요할 것이다.

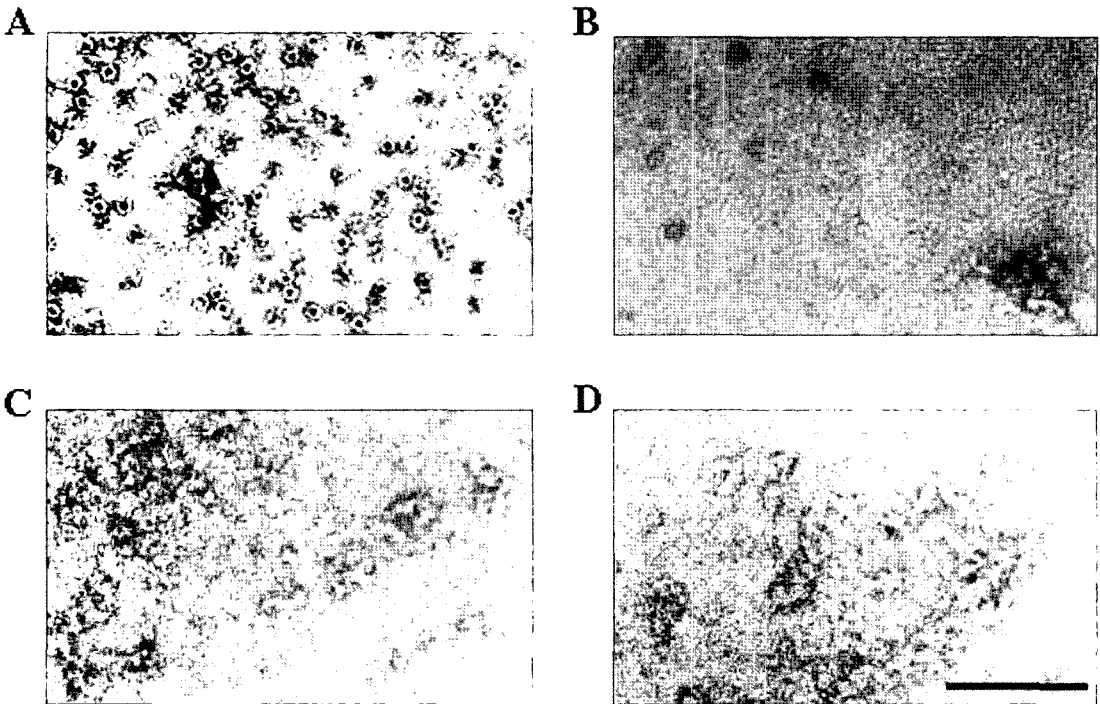


Fig. 7. Electron micrographs of inactive P60 complex. (A) Control of P60 complex. (B) Inactive P60 complex incubating 60 min at 90°C. (C) Inactive P60 complex incubating 30 min at 100°C. (D) Inactive P60 complex incubating 5 min at 110°C. Scale bar represent 100 nm.



## 참 고 문 헌

- Andr S, Frey G, Jaenicke R, Stetter K: The thermosome from *Methanopyrus kandleri* possesses an  $\text{NH}_4^+$ -dependent ATPase activity. Eur J Biochem 255: 93-99, 1998.
- Andr S, Frey G, Nitsch M, Baumeister W, Stetter KO: Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*. FEBS Letters 379: 127-131, 1996.
- Cheong G-W, Guckenberger R, Fuchs K-H, Gross H, Baumeister W: The structure of the surface layer of *Methanoplanus limicola* obtained by a combined electron microscopy and scanning tunneling microscopy approach. J Struct Biol 111: 125-134, 1993.
- Cheong G-W, Typke D, Baumeister W: Projected structure of the surface layer of *Methanoplanus limicola* at 10Å resolution obtained by electron cryomicroscopy. J Struct Biol 117: 138-144, 1996.
- Dürr R: Displacement field analysis: calculation of distortion measures from displacement maps. Ultramicroscopy 38: 135-141, 1991.
- Ellis RJ: Cytosolic chaperonin confirmed. Nature (London) 358: 191-192, 1992.
- Ellis RJ, van der Vies SM: Molecular chaperones. Annu Rev Biochem 60: 321-347, 1991.
- Gething MJ, Sambrook J: Protein folding in the cell. Nature (London). 355: 33-45, 1992.
- Hartl FU: Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381: 571-579, 1996.
- Hegerl R: The EM program package; A platform of image processing in biological electron microscopy. J Struct Biol 116: 30-34, 1996.
- Hendrick JP, Hartl FU: Molecular chaperone functions of heat shock proteins. Annu Rev Biochem 62: 349-384, 1993.
- Kiselev NA, Sherman MB, Tsuprun VL: Negative staining of proteins. Electron Microsc Rev 3: 43-72, 1990.
- Klumpp M, Baumeister W: The thermosome; archetype of group II chaperonins. FEBS Letters 430: 73-77, 1998.
- Kobayashi T, Kwak Y, Akiba T, Kudo T, Horikoshi K: *Thermococcus profundus* sp. nov., A new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. system Appl Microbiol 17: 232-236, 1994.
- Marco S, Urena D, Carrascosa JL, Waldmann T, Peters J, Hegerl R, Pfeifer G, Sack-kongehl H, Baumeister W: The molecular chaperone TF55: assessment of symmetry. FEBS Letters 341: 152-155, 1994.
- Nitsch M, Klumpp M, Lupas A, Baumeister W: The thermosome: alternating  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit within the chaperonin of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. J Mol Biol 267: 142-149, 1997.
- Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W: A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. EMBO J 10: 1711-1722, 1991.
- Phipps BM, Typke D, Hegerl R, Volker S, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W: Structure of a molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium. Nature 361: 475-477, 1993.
- Steinbrecht RA, Zierold K: Cryotechniques in biological electron microscopy. Springer-Verlag, 1987.
- Saxton WO, Pitt TJ, Horner M: Digital image processing the SEMPER system. Ultramicroscopy 4: 133-139, 1979.
- Stewart M, Vigers G: Electron microscopy of frozen-hydrated biological material. Nature 319: 631-636, 1986.
- Weber K, Pringle JR, Osborn M: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. Methods Enzymol 26: 3-27, 1972.

## &lt; 국문 초록 &gt;

초고온 archaeon인 *Thermococcus profundus*에서 실린드형태의 단백질 복합체를 분리. 생화학적 특성과 구조를 규명하였다. 전자현미경과 영상처리(image processing)를 이용한 구조 분석으로 8개의 subunit으로 이루어진 링(ring) 형태가 두 개 겹쳐져 가운데 통로를 가지는 실린드형태로 이루어진 복합체를 알 수 있었다. 또한 60 kDa 단백질(P60 complex)로 구성된 homomultimer임을 보여 주고 있다. 이 복합체는 80°C 이상에서도 강한 ATPase의 활성을 보여주는 강한 내열성 단백질임을 알 수 있다. P60 complex는 초고온 archaeon이 높은 온도에서 적응하며 생존하는데 매우 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있다.