

## Yeast two-hybrid system을 활용한 해양무척추생물의 호르몬의존성 단백질의 탐색

정유정 · 신지혜 · 맹세정 · 고혜연 · 손영창  
강릉대학교 해양생명공학부

### 서론

진핵세포의 세포내 주요 단백질과 복합체를 구성하는 단백질간의 상호작용을 분석하여 각각의 기능을 밝히고 상대적인 관계를 규명하기 위해 개발된 yeast two-hybrid system (Field and Song, 1989)은 현재까지도 새로운 기능을 가진 단백질을 검색하고 단백질-단백질 상호관계를 이해하는데 중요한 실험방법으로 널리 이용되고 있다. 호르몬의존성 핵수용체 및 핵수용체를 포함하는 주요 전사조인자 complex가 이 system에 의하여 비교적 최근에 밝혀졌다 (Lee et al., 1999; Ko et al., 2000). 본 연구에서는 아직까지 정체가 불확실한 해양무척추동물의 핵수용체를 동정하기 위하여 성게(*Strongylocentrotus purpuratus*) 난모세포유래의 단백질을 발현하는 cDNA library로부터 호르몬의존성 단백질을 yeast two-hybrid system으로 탐색하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. cDNA library

성게의 모든 성숙시기가 포함된 난모세포의 mRNA를 Xho I-(dT)<sub>15</sub> primer로 역전사하여 얻어진 평균 1.7 kb의 cDNA가 삽입된 yeast 발현벡터, pACT2 (Clontech, CA, USA) library를 증폭하여 약 1 ug/ul의 cDNA library를 확보하여 실험에 사용하였다.

#### 2. 탐색자 (bait protein) .

yeast의 GAL4 전사인자의 activation domain (AD)이 융합된 library를 screening 하기 위하여 DNA-binding domain (DBD)이 발현되는 pGBT9 벡터 (Clontech, CA, USA)에 포유동물유래의 retinoid X receptor (RXR) 및 liver X receptor와 결합하는 전사조인자 (ASC-2; Lee et al., 1999) 단편 DNA를 삽입하였다. 탐색자의 효모 세포내 발현은 GAL4-DBD 항체 (Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 이용한 Western blot 및 효모균주 (*Saccharomyces cerevisiae* strains Y190, CG-1945)에 제작한 plasmid construct를 각각 형질전환시키고 promoter upstream에 GAL4 upstream activation sequence(UAS)가 존재하는 reporter gene (*lacZ*)의 발현을 in

vivo에서 관찰하였다 (colony lift assay) (그림 1).

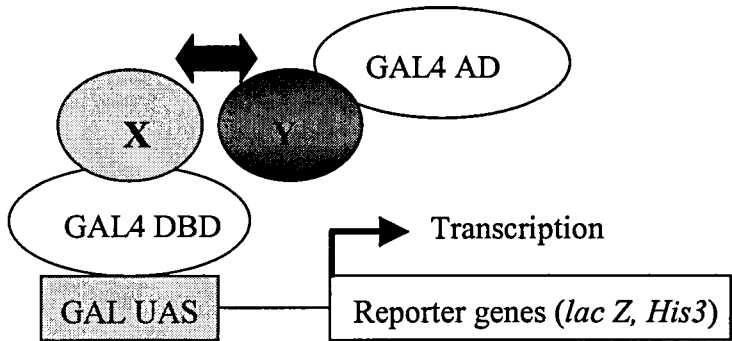


그림 1. GAL4-based yeast two-hybrid system.

### 3. Screening

전술의 탐색자 plasmid DNA를 PEG/LiAc 용액으로 형질전환시킨 다음 연속적으로 library DNA 500 ug을 효모세포내로 도입하였다. 형질전환된 효모세포를 선택하고 단백질-단백질 상호결합을 확인하기 위하여 아미노산 W/L/H이 결핍된 synthetic dropout agar배지에서 3 ~ 12일간 (30℃) 배양하였다. RXR 결합성 단백질을 screening할 때는 all-trans retinoic acid를 처리하였다. 결핍된 아미노산조성 배지에서 성장하는 효모 colony의 직경이 2~3 mm 에 달하는 것을 회수하여 colony lift assay를 실시하여 blue-white screening으로 단백질간 상호작용을 재검토하였다.

### 결과 및 요약

RXR-결합단백질은 36개, ASC-2 결합단백질은 6개 확인되었다. 현재, 추출한 library 유래의 plasmid에 삽입된 염기서열을 분석중이다.

### 참고문헌

- Field, S. and Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340: 245-247.
- Lee SK, Anzick SL, Choi JE, Bubendorf L, Guan XY, et al., Lee JW. 1999. A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors in vivo. J. Biol. Chem. 274: 34283-93.
- Ko L, Cardona GR, Chin WW. 2000. Thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 6212-7.