

## 해양무척추동물에서 레티놀산 수용체의 결합단백질 탐색 및 기능 분석

맹세정 · 박우동 · 정유정 · 손영창  
강릉대학교

### 서론

진핵세포의 세포내 주요 단백질과 복합체를 구성하는 단백질간의 상호작용을 분석하여 각각의 기능을 밝히고 상대적인 관계를 규명하기 위해 개발된 yeast two-hybrid system은 현재까지도 새로운 기능을 가진 단백질을 검색하고 단백질-단백질 상호관계를 이해하는데 중요한 실험방법으로 널리 이용되고 있다. 특히, 호르몬의존성 핵수용체 및 핵수용체를 포함하는 주요 전사조인자 complex가 이 system에 의하여 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 포유동물세포 유래인 retinoid X receptor(RXR)와 반응하는 호르몬의존성 단백질을 yeast two-hybrid system으로 탐색하고, RXR과 표적단백질의 상호작용을 mammalian two-hybrid방법으로 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. Yeast two-hybrid system

성게의 모든 성숙시기가 포함된 난모세포의 mRNA를 Xho I -(dT)15 primer로 역전사하여 얻어진 평균 1.7kb의 cDNA를 yeast 발현벡터 pACT2(Clontech, CA,USA)에 증폭하여 약  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 cDNA library를 확보하였고, Bait protein으로는 DNA-binding domain(DBD)이 발현되는 pGBT9 벡터(Clontech, CA,USA)에 평균 0.6Kb인 포유동물유래의 RXR cDNA를 삽입하였다. 효모균주(*Saccharomyces cerevisiae* strains Y190)에 제작한 plasmid construct를 각각 형질 전환시키고 reporter gene(*lacZ*)의 발현을 in vivo에서 관찰하였다(colony life assay). 형질 전환된 효모세포를 선택하고 단백질-단백질 상호결합을 확인하기 위하여 아미노산 Trp/Leu/His이 결핍된 synthetic dropout agar배지에서 3~12일간(30°C) 배양하였으며, RXR 결합성 단백질을 screening 할 때는 all-trans retinoic acid(RA) 또는 9-cis RA를 처리하였다. 결핍된 아미노산조성배지에서 성장하는 효모 colony의 직경이 2~3mm에 달하는 것을 colony life assay를 실시하여 blue-white screening으로 단백질 간 상호작용을 재검토하였다.

## 2. Mammalian two-hybrid

Yeast two-hybrid system으로 동정한 약 0.6 kb의 유전자를 pCMX-VP16-N에 삽입하고, Gal-4 fusion RXR, GAL4-Tk-luciferase와 동시에 형질도입시켰으며, hormone 반응성은 9-*cis* RA를 처리하여 조사하였다. 실험군간의 형질 도입율을 보정하기 위하여  $\beta$ -galactosidase assay (200mM sodium phosphate buffer pH 7.3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM  $\beta$ -mercaptoethanol(98%), 1.33mg/ml O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(OPNG))를 실시하였으며, 전사활성을 조사하기 위하여 luciferase assay buffer (1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8, 0.5M MgCl<sub>2</sub>, 0.1M ATP, 10mM luciferin) 및 luminometer (Berthold, Germany)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 요약

Yeast two-hybrid system을 사용하여 RXR과 상호작용을 보이는 미지의 단백질을 동정하였으며, full-length cDNA를 확보하였다. 번역물의 크기를 분석한 결과 분자량 약 40 kDa의 단백질로 예상되었다. Mammalian two-hybrid에 의해 미지의 단백질은 RXR과 9-*cis* RA의존적으로 반응하는 분자임을 확인하였다.

## 참고문헌

- 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. USA., 97, 6212-6217.
- Lee SK, Anzick SL, Choi JE, Bubendorf L, Guan XY, Jung YK, Kallioniemi OP, Kononen J, Trent JM, Azorsa D, Jhun BH, Cheong JH, Lee YC, Meltzer PS, 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, 34283-34293.