

## 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 단백질 합성 개시

강 현 아  
생명공학연구소

각 생명체의 특징적인 형질과 기능을 규정짓는 유전자의 발현과정은 DNA로부터 messenger RNA(mRNA)로 유전정보가 전달되는 transcription과 mRNA의 유전암호를 해독하여 단백질을 합성하는 translation으로 크게 나누어진다. 따라서 단백질 합성과정인 translation은 transcription과 더불어 생명현상의 가장 기본적인 과정이며 또한 특정 유전자의 발현을 조절하게 되는 중요한 단계이기도 하다. 더욱이 다른 대사 활동에 비해 단백질 합성과정에서는 많은 에너지가 소모되므로 단백질 합성활동은 세포의 전체적인 생리 상태에 민감하게 반응하게 된다(37). 네 가지 문자체계(G, A, U, C)로 되어 있는 유전정보가 20가지 문자체계(20가지 아미노산)로 되어 있는 단백질로 번역되는 과정인 translation은 ribosome, tRNA, rRNA 외에도 여러 단백질 인자들이 관여하는 매우 복잡한 과정으로서, initiation, elongation 및 termination의 세 단계로 나누어 볼 수 있다. 진핵 세포에서의 translation initiation은 small 40S ribosomal subunit가 번역할 mRNA에 붙은 후 large 60S subunit과 결합하여 80S initiation complex를 형성함으로써 단백질 합성을 준비하는 단계이다. Elongation 단계에서 80S ribosome은 mRNA를 타고 움직이면서 염기 서열을 아미노산 서열로 번역하여 peptide bond 형성을 통해 단백질을 합성한다. 결국 80S ribosome이 종결 코돈(termination codon)에 도달하면 40S와 60S subunit으로 분리됨으로써 단백질 합성은 종결된다. 단백질 합성과정의 rate-limiting step은 initiation phase이기에(40), 일반적으로 translation 조절은 대부분 initiation phase에서 일어나게 된다. 따라서 생명현상에 대한 기본적인 이해와 더불어 효율적인 유전자 발현에 대한 정보를 얻기 위해서는 단백질 합성 개시과정에 대해 보다 체계적인 연구가 요구된다. 본고에서는 translation에 대한 생화학적 연구방법의 기초를 제공해 준 고등 진핵세포에서의 translation initiation phase에 대해 먼저 간단히 살펴보고, 이어서 진핵세포에 대한 분자생물학의 중요한 모델시스템이면서 재조합 단백질의 숙주세포로도 유용하게 이용되고 있는 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 translation initiation에 대한 연구 현황을 중점적으로 다루어 보고자 한다.

### 고등 진핵세포에서의 단백질 합성 개시과정

단백질 합성의 개시과정은 80S ribosome/Met-tRNAi/mRNA complex 형성을 유도하는 일련의 반응들로 이루어지며, 이에 대한 정보는 최근까지는 주로 rabbit reticulocytes, wheat germ 및 포유동물 세포 같은 고등 진핵세포를 대상으로 한 생화학적 연구를 통하여 얻어져 왔다. 고등 진핵세포에서의 단백질 합성개시에 관한 연구들은 eukaryotic initiation factors(eIF)라고 명명된 많은 단백질 인자들이 개시단계에 관여하고 있음을 보여 주었다(Table 1). 이들 단백질 인자들은 단백질 합성 개시과정을 모방하는 시험관 모델 반응에서의 활성을 근거로 하여 세포 추출물로부터 분리 정제되었다(8, 48).

단백질 합성 개시과정에 대해 잠정적으로 제시된 경로(Fig. 1)에 따르면, ribosome이 단백질 합성을 시작할 수 있도록 두 개시인자, eIF-1A와 eIF-3가 ribosome의 40S subunit에 붙어 80S ribosome이 40S와 60S subunit으로 분리되도록 촉진시킨다(28). 한편 보조 인자인 eIF-3A도 60S subunit에 붙음으로써 두 ribosome subunits간의 결합을 막아준다는 보고가 있다(56). 뒤이어 eIF-2, GTP와 methionyl-tRNA(Met-tRNAi)로 구성된 ternary complex가 40S ribosome subunit과 결합하여 43S preinitiation complex를 형성하는데(9), 이때 eIF-3와 그 보조인자인 eIF-2C가 ternary complex를 안정화시킨다고 알려져 있다(33, 54).

Kozak에 의해 주장된 scanning model(45)에 의하면 그 다음 단계로 43S preinitiation complex가 eIF-4F가 붙어있는 mRNA의 5' 말단에 가서 결합하여 48S preinitiation complex를 형성하게 된다. eIF-4F는 cap-binding protein complex로서 eIF-4A, eIF-4E와 p220이라 명명된 세 종류의 단백질 인자들로 구성되어 있어(31), RNA-dependent ATPase 활성을 지닌 eIF-4A(32)와 RNA-binding domain을 지닌 eIF-4B(49)의 합동작용에 의해 mRNA의 5' 말단에 있는 이차구조가 풀어지게 된다. Met-tRNAi를 지닌 40S ribosome은 풀어진 mRNA를 따라 움직이면서 개시 코돈(initiation codon)을 찾아 나서게 되는데 대부분 가장 처음으로 만나는 적합한 AUG 코돈을 선택하여 단백질 합성을 개시하게 된다. 개시 코돈의 인지는 그 주변 염기서열에 의해 영향을 받는데 가장 적합한 서열은 ACCAUGG으로 알려져 있다(44). 이와는 달리 internal initiation model에 따른 경로에 의하면 43S initiation complex

**Table 1.** Mammalian translation initiation factors

Name	Other names	Factor mass	Subunits mass	Functions
eIF-1		15		Stimulates formation of 40S preinitiation complexes
eIF-1A	eIF-4C	17.6		Ribosome dissociation; stimulates 40S preinitiation complexes
eIF-2		130	$\alpha$ 36.1 $\beta$ 38.4 $\gamma$ 55	GTP-dependent Met-tRNA binding to 40S ribosome
eIF-2A		65		AUG-dependent Met-tRNA binding to 40S ribosome
eIF-2B	GEF	272	$\alpha$ 26 $\beta$ 39 $\gamma$ 58 $\delta$ 67 $\epsilon$ 82	GTP;GDP exchange
eIF-2C	Co-eIF-2A	94		Stabilizes ternary complex
eIF-3		550	$\alpha$ 35 $\beta$ 36 $\gamma$ 40 $\delta$ 44 $\epsilon$ 47 $\zeta$ 67 $\eta$ 115 $\theta$ 170	Stimulates formation of 40S preinitiation complex
eIF-3A	eIF-6	25		Ribosome dissociation; binds 60S ribosome
eIF-4A		44.4		RNA-dependent ATPase; helicase; stimulates mRNA binding
eIF-4B		80		Helicase; stimulates mRNA binding
eIF-4F	CBP-II	270		Cap recognition; helicase
	eIF-4E		$\alpha$ 25	Stimulates mRNA binding
	eIF-4A		$\beta$ 44.4	
	p220		$\gamma$ 220	
eIF-5		150		
eIF-5A	eIF-4D	16.7		Stimulates ribosome junction.

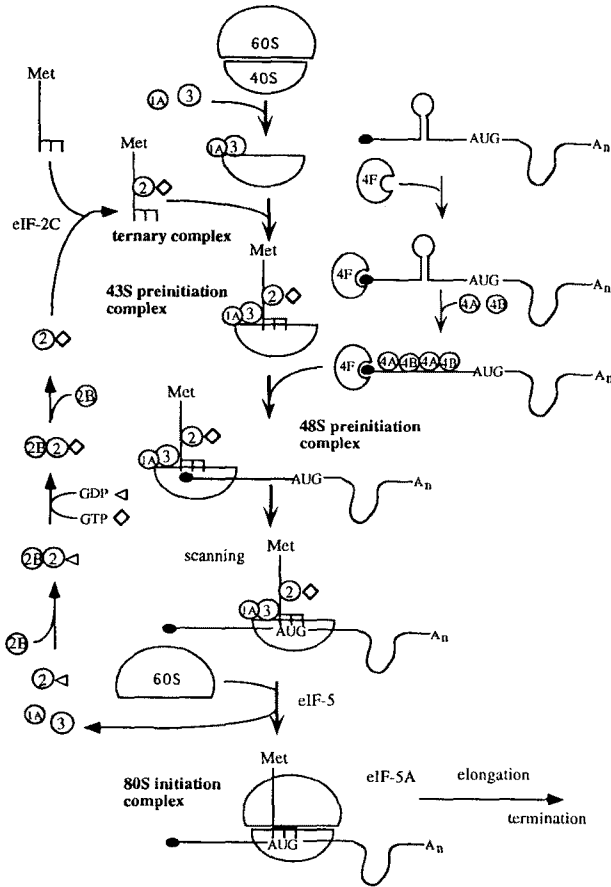
가 mRNA의 5' 말단에 붙지 않고 곧바로 개시 코돈 위치 또는 그 주변에 가서 붙는다(58).

일단 40S ribosome이 적합한 개시 코돈 AUG에 도달하면 60S subunit과 결합하여 80S initiation complex를 형성하는데 이 과정은 eIF-5(14)에 의해 촉진되고 GTP hydrolysis를 통해 ribosome에 붙어있던 모든 개시 인자들은 떨어져 나오게된다. GTP hydrolysis 결과로 생성된 eIF-2-GDP complex가 GTP 형태로 전환되어야만 다시 새로운 translation을 시작할 수 있는데, 이 반응은 guanine nucleotide exchange factor인 eIF-2B에 의해서 촉진된다(23). 80S initiation complex가 형성되면 단백질 합성과정의 elongation phase로 들어가게 된다. 그러나 첫번째 peptide bond 형성과정은 elongation phase에서 일어나는 그 후의 peptide bond 형성 과정과는 달리 특이하다. 즉, 첫번째 peptide bond 형성에는 ribosome의 P site에 전하를 띤  $\alpha$ -amide group을 지닌 Met-tRNA<sub>i</sub>가 작용하지만, 그 후의 elongation 과정에는 peptidyl-tRNA가 작용을 한다. 이런 특이성 때문에 첫번째 peptide bond 형성과정은 elongation phase에 속하기보다는 initiation phase의 마지막 단계로 간주되었고 이는 eIF-5A에 의해 촉진된다고 알려져 왔다(38).

생물산업

## 효모에서의 단백질 합성 개시과정

앞서 기술한 진핵세포에서의 단백질 합성 개시경로는 세포 추출물에서 분리 정제된 단백질 인자들이 시험관에서 잠정적인 initiation complex 형성을 촉진하는 활성을 기초로 하여 추정되었기에 이를 뒷받침할 생체 내에서의 검증이 필요하게 되었다. 근래에 들어서 이와 같은 생체 내에서의 단백질 합성과정 분석을 위한 유용한 모델체계로 분자유전학적 분석이 매우 용이한 효모, 특히 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 단백질 합성과정이 큰 관심을 끌고 있다(47). 단세포 진핵세포인 효모에서는 mutagenesis와 gene replacement technique(34) 등을 이용한 유전학적 분석을 통해 개시 인자들의 생체 내에서의 기능 및 단백질 합성 과정에서의 실제적인 역할에 대해 상세한 정보를 얻을 수 있게 되었다. 그 동안 유전학적 분석 결과를 보충해 줄 수 있는 효모 유래의 *in vitro* translation system이 미처 개발되지 못하여 효모에서의 단백질 합성에 관한 연구가 미진하였다. 그러나 근래에 효모 *in vitro* translation system(27)이 확립됨에 따라 효모 단백질 합성과정에 대한 생화학적 분석은 분자유전학적 분석과 더불어 진핵 세포에서의 단백질 합



**Fig. 1.** Model of translation initiation pathway in mammalian cells\*.

\*The figure is partly modified and obtained from the review(37), where the whole protein synthesis pathway is presented.

성 경로에 대한 많은 귀중한 정보를 제공하고 있다.

**효모의 단백질 합성 개시인자들**

효모와 고등 진핵세포의 단백질 합성 체계는 매우 유사하다. 효모의 mRNA도 대부분이 한 mRNA에 하나의 유전자에 대한 정보가 담겨있는 monocistronic이며, 5' cap structure와 3' poly(A) tail을 지니고 있다(59). 원핵세포의 mRNA에서 발견되는 ribosome binding site가 효모 mRNA에도 없어서 효모 ribosome은 고등 진핵세포에서처럼 scanning mechanism에 의해 일반적으로 5' 말단에 가장 근접한 개시 코돈 AUG를 선택하여 단백질 합성을 시작하게 된다고 보고있다(15). 이와 같은 유사성은 Table 2에서 보듯이 효모와 포유동물 개시인자들간의 일차구조 및 기능의 유사성에서도 나타나고 있다.

근래에 들어 효모의 단백질 합성 개시인자의 유전자들이 여러 흥미 있는 방법들을 통해 클로닝되었다. 효모에서의 단백질 합성에 관한 연구 초창기에는 전통적인 유전학적 분석 방

법의 하나로 무작위 돌연변이를 유도하여 단백질 합성이 저해된 여러 변이주를 선별하였었다(36). 그중 *PRT1*이라 명명된 변이주는 ternary complex가 40S ribosomal subunit과 결합하여 43S preinitiation complex를 형성하는 단계에 결함을 보여서, *PRT1* 단백질은 여러 subunit으로 구성된 eIF-3의 한 subunit에 해당됨을 시사하였다(25). 최근 효모 ribosome을 고농도 염으로 씻은 추출액으로부터 포유동물 translation machinery로 구성된 80S initiation complex 형성을 촉진해 준 효모 eIF-3가 분리 정제되었다. 효모 eIF-3는 8개의 subunits으로 구성되었는데(50), 이중 90 kDa의 subunit이 *PRT1*의 단백질 산물에 해당됨이 밝혀졌다. 이는 생화학적 연구방법의 결과가 이미 오래 전에 얻어진 유전학적 분석 결과를 상호 보완해 준 좋은 예이며, 또한 효모의 단백질 합성 개시인자가 고등 진핵세포의 translation machinery에서도 작용할 수 있음을 보여 준 경우이다.

앞에서 언급했던 효모 eIF-3의 경우처럼 고등 진핵세포의 개시인자들을 찾아내고 분리 정제할 때 적용되었던 전통적인 생화학적 연구방법에 의해서 효모 eIF-5도 찾아졌다. 효모의 43S preinitiation complex가 60S ribosomal subunit과 결합하여 80S ribosome initiation complex를 형성하는 과정을 촉진하며 동시에 GTPase 활성을 지닌 단백질을 추적함으로써 효모 eIF-5를 분리 정제하게 되었고, 정제된 효모 eIF-5 단백질에 대한 항체를 이용하여 eIF-5를 암호하는 유전자가 클로닝되었다. 이 효모 단백질 인자는 아미노산 배열에서 포유동물 eIF-5와 39% 정도 동일함을 보였다(14).

효모의 유전학적 분석기술의 장점을 최대한 이용하여 Donahue가 이끄는 연구팀은 개시 코돈변이에 대한 extragenic suppressor를 찾아 3개의 *SUI*(suppressors of initiation codon mutant) 유전자들을 클로닝하였다. 이들중 *SUI 2*(17)와 *SUI3*(24)의 단백질 산물은 인간 eIF-2 $\alpha$  및 eIF-2 $\beta$ 와 아미노산 배열이 각각 54%와 42% 정도 동일하여 효모 eIF-2 $\alpha$ 와 eIF-2 $\beta$ 에 대한 유전자들로 밝혀졌다. 이 연구 결과는 eIF-2가 실제 세포내에서 단백질 합성 초기과정에 관여하며 특히 개시지역을 결정하는 데에 중요한 역할을 함을 유전학적으로 증명하였다는 점에 큰 의미가 있다. *SUI1*(63)은 그 생화학적 특징 및 최근 토끼에서 분리된 eIF-1과의 아미노산 배열 유사성(41)에 근거하여 효모의 eIF-1에 해당된다고 추정되고 있다. 또한 이 연구팀은 mRNA의 stem-loop structure가 단백질 합성개시를 저해한다는 사실을 이용하여 이에 대한 extragenic suppressor를 탐색하여 4개의 유전자 *SSL1-SSL 4*(suppressor of stem-loop)를 클로닝하였지만(64), 이들에 해당되는 기존의 단백질 합성 개시인자가 보고되어 있지 않아서 이들이 새로운 단백질 합성 개시인자임을 뒷받침해줄 생화학적 연구 결과가 필요한 상태이다.

한편 한 특정 유전자 발현에 대한 심도 있는 분자유전학적

**Table 2.** Comparison of translation initiation factors from yeast and mammals

Factor	Genes	Yeast/mam. (Identity)	Mass (kDa)	Function in translation	Isolation procedure
eIF 1	<i>SUI1</i>	-	13	Recognitoin of the start codon	Suppressor of AUG mutant
eIF 1A	<i>TIF11</i>	66%	17	Stabilization of preinitiation complex	$\lambda$ gt11 library
eIF-2 $\alpha$	<i>SUI2</i>	58%	34	Recognitoin of the start codon	Suppressor of AUG mutant
$\beta$	<i>SUI3</i>	42%	31	Formation of ternary complex	Suppressor of AUG mutant
$\gamma$	<i>GCD11</i>	71%	58		Transacting regulator of GCN4 expression
eIF-2B $\alpha$	<i>GCN3</i>	-	34	GTP : GDP exchange	Transacting regulator of GCN4 expression
$\beta$	<i>GCD7</i>	-	43		
$\gamma$	<i>GCD1</i>	-	68		
$\delta$	<i>GCD2</i>	-	71		
$\epsilon$	<i>GCD6</i>	-	81		
eIF-3	<i>PRT1</i>	-	90	mRNA binding	ts-mutant from the Hartwell collection
	<i>GCD10</i>	-	55	mRNA binding	Transacting regulator of GCN4 expression
eIF-4A	<i>TIF1</i>	65%	46	RNA helicase with eIF-4B	Suppressor of mitochondrial mutation
	<i>TIF2</i>				
eIF-4B	<i>TIF3</i>	26%	48.5	RNA helicase with eIF-4A	$\lambda$ gt11 library, Suppressor of eIF-4A mutant
eIF-4E	<i>CDC33</i>	33%	24	Cap binding	$\lambda$ gt11 library
p150	<i>TIF4631</i>	-	150	Cap binding	$\lambda$ gt11 library
	<i>TIF4632</i>				
eIF-5	<i>TIF5</i>	39%	45	Stimulate ribosome junction	$\lambda$ gt11 library
eIF-5A	<i>TIF51A</i>	63%	17	?	Screening with eIF-5A cDNA from human
	<i>TIF51B</i>				

The yeast/mammalian homology represents the percentage of identical amino acids between the proteins. The indicated masses of the proteis are deduced from sequence data.

연구가 효모의 여러 단백질 합성 개시인자들을 발견할 수 있는 기회를 제공하였다. 아미노산 생합성 관련 유전자들의 transcription activator인 GCN4는 아미노산 결핍정도에 따라 그 발현정도가 translation initiation 단계에서 조절되는데, GCN4 발현에 직접 또는 간접으로 영향을 미치는 많은 돌연변이주들(GCD와 GCN 계열)이 알려져 있다(39). 상기 언급한 SUI2와 SUI3 변이주에서도 GCN4 발현 조절이 상실됨이 관찰되어 보편적인 단백질 합성 개시 인자인 eIF-2가 그 발현조절에 중요한 역할을 하고 있다고 추정되었다(62). 예상대로 GCN4 발현 조절에 이상이 있는 여러 GCD, GCN 변이주들을 분석한 결과 인간 eIF-2 $\gamma$ 의 아미노산 배열과 71%의 동일성을 보인 효모 eIF-2 $\gamma$ 에 대한 유전자(GCD11)와 eIF-2와 결합하는 eIF-2B에 해당되는 유전자들(GCD1, GCD2, GCN3, GCD6, GCD7)을 찾게 되었다(12, 18, 35). 또한 유전학적 분석을 통해서 GCN4의 translational repressor에 대한 유전자로 알려졌던 GCD10은 효모 eIF-3의 여러 subunit들 중 RNA 결합 활성을 지닌 54.6 kDa에 해당되는 단백질 인자의 유전자로 밝혀졌다(26).

단백질 합성에 대한 연구와는 전혀 무관하게 효모 미토콘드리아의 기능을 연구하는 과정 중에 우연히 단백질 합성 개시 인자에 대한 유전자가 발견되기도 하였다. 효모에서 mitochondrial missense mutation에 대한 suppressor를 탐색하던 중 두 유전자, TIF1과 TIF2를 찾았는데 이 두 유전자는 포유동물 eIF-4A와 65% 동일한 아미노산 배열을 보이는 단백질

생물산업

에 대한 정보를 갖고 있어 효모 eIF-4A에 대한 유전자로 간주되었다(46). TIF1과 TIF2 단백질이 결핍된 변이주의 세포 추출물로 만들어진 *in vitro* translation system은 단백질 합성 능력을 상실하였고, 분리 정제된 TIF1 또는 TIF2 단백질 첨가시 다시 단백질 합성 능력이 회복되는 생화학적 실험결과가 얻어짐으로써 TIF1과 TIF2 단백질이 전체 단백질 합성에 필수적인 역할을 하고 있음이 입증되었다(10).

간접적인 연구 방법에 의해 단백질 합성 개시인자에 대한 유전자들을 찾게 된 또 다른 예는 mRNA의 cap 구조( $m^7G_{ppp}X$ , X; any nucleotide)와 유사한  $m^7GDP$  affinity column을 이용하여 세포 추출물에서 cap binding protein들을 찾고자 한 경우이다.  $m^7GDP$  column에서 얻어진 배출액에 eIF-4E가 주된 단백질로 존재하므로 그 배출액에 대한 polyclonal 항체를 사용하여 효모 genome을 지닌  $\lambda$ gt11 library를 탐색했을 때 효모 eIF-4E에 해당되는 유전자를 찾게되었다(2). 효모 eIF-4E는 아미노산 배열에서 포유동물 eIF-4E와 33% 정도만의 동일성을 보였지만, 효모에서 발현된 포유동물 eIF-4E는 효모 eIF-4E의 기능을 대체할 수 있었다(3). 놀랍게도 효모 eIF-4E의 유전자는 세포 주기에 관련된 유전자로 알려진 CDC33과 동일한 유전자임이 밝혀져 eIF-4E의 활성이 세포 주기조절에도 중요한 역할을 하고 있음을 시사하였다(11). eIF-4E가 결핍된 효모 *in vitro* translation system에서 대부분의 mRNA에 대한 translation 활성이 저하되지만(4) 일부 mRNA들의 단백질로의

번역은 크게 영향을 받지 않아(7), 일부 특정 mRNA 경우 eIF-4E의 도움 없이도 43S preinitiation complex에 의해 인지될 수 있다고 추정된다. 효모 eIF-4E외에도 m<sup>7</sup>GDP column 배출액으로부터 18 kDa과 cap-binding protein complex의 일원으로 간주되는 96 kDa 및 150 kDa 단백질 인자들이 분리되었고(29), m<sup>7</sup>GDP column 배출액에 대한 항체를 이용한 검색을 통하여 포유동물 eIF-4F의 220 kDa 단백질 인자에 상응하는 150 kDa 단백질 인자에 대한 유전자인 *TIF4631*와 *TIF4632*도 확인되었다(30). 공교롭게도 이 검색과정에서 예기치 않게 mammalian eIF-4B와 26%정도 아미노산 배열의 동일성을 보이며 RNA-binding protein의 특징을 지닌 단백질의 유전자(*TIF3*)가 얻어졌다(5). 다른 연구팀에서 *TIF3*와 동일한 유전자(*STMI*)가 효모 eIF-4A 돌연변이에 대한 multicopy suppressor로서 얻어져 *TIF3*가 eIF-4A와 상호 작용한다고 추정되어온 eIF-4B에 대한 유전자임을 입증하여 생체 내에서 실제로 eIF-4A와 eIF-4B가 결합한다는 유전학적 증거를 제공하였다(19).

효모와 고등 진핵세포의 translation machinery가 상당히 유사함에 근거하여, 인간 eIF-5A의 cDNA를 hybridization probe로 사용하여 효모 eIF-5A에 대한 두 유전자 *TIF51A*과 *TIF51B*가 클로닝되었다. 효모 eIF-5A는 인간 eIF-5A와 63%의 높은 동일성을 보였고 포유동물 유래의 translation machinery로 구성된 분석 체계에서 80S initiation complex 형성을 촉진하였다(57). 그러나 eIF-5A가 결합된 효모 변이주는 성장 속도가 극도로 감소됨에도 불구하고 총단백질 합성 능력을 크게 저하되지 않아서 일반적인 단백질 합성에서의 실제 eIF-5A 역할에 대한 의구심이 제기되었다(42). 따라서 현재 eIF-5A는 보편적인 단백질 합성 개시 인자로 보기 어렵다는 견해가 지배적이다. 이는 생화학적 분석방법에 의해서 추정되었던 단백질 인자의 기능이 유전학적 검증에 의해 수정된 좋은 예이다.

효모 eIF-1A에 대한 유전자(*TIF11*)의 경우도 인간 eIF-1A에 대해 얻어진 polyclonal 항체를 probe로 사용한 탐색을 통해 클로닝되었다(61). 효모 eIF-1A와 인간 eIF-1A의 아미노산 서열은 65%의 동일성을 보였고, *in vivo* 및 *in vitro* assay system에서 인간 eIF-1A와 효모 eIF-1A는 서로 대신하여 작용할 수 있어서 효모와 포유동물 세포의 eIF-1A는 그 구조와 기능 면에서 상당히 유사함을 보여주고 있다.

위에서 살펴본 바와 같이 현재까지 대부분의 포유동물 단백질 합성 개시인자에 상응하는 효모 단백질 인자들과 그 유전자들이 보고되었지만, 아직 eIF-2A와 eIF-3A에 해당되는 효모 단백질에 관한 보고는 없어 단백질 합성 과정에서 이들의 역할에 대한 유전학적 증거는 전혀 제시되지 않은 상태이다.

### 효모 translation initiation의 특이성

효모에서의 단백질 합성 과정은 고등 진핵세포에서의 합성

과정과 상당한 유사성을 보이지만 그 나름대로의 특이성도 지니고 있다. 효모 mRNA의 translation initiator regions에 대한 비교 분석결과 가장 적합한 AUG 개시 코돈 주변 염기서열은 포유동물 세포의 5'ACCAUGG3'과는 약간 달리 5'A<sup>A</sup>A<sup>A</sup><sub>Y</sub>U AUGUCU3'로 밝혀졌다(15). 효모에서도 -3과 +4 위치의 염기종류가 비교적 고정되어 있지만 *CYC1* 유전자나 *HIS4* 유전자에서 -3 또는 +4 위치의 염기가 잘 이용되지 않은 염기로 바뀌었을 때 그 발현효율이 비교적 소폭으로 감소됨이 관찰되어서(16), 포유동물 세포에 비해 효모에서는 AUG 주변의 염기 서열이 translation 효율에 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 AUG 앞에 놓인 mRNA의 secondary structure는 포유동물 세포에서보다 효모에서 translation initiation을 크게 저하시킨다. 포유동물 세포의 mRNA 경우 -30 Kcal/mol 이하의 free energy를 갖는 stem-loop structure는 40S ribosome에 의해 파괴될 수 있지만(43), 효모 mRNA의 경우 -7 Kcal/mol 이하의 비교적 약한 stem-loop structure라도 40S ribosome subunits이 통과할 수 없는 장애물이 된다(6). 특히 stem-loop structure가 AUG 코돈 가까이 존재할수록 그 억제 효과는 더욱 크게 나타남이 관찰되었다(60). 이런 특징은 평균 길이가 약 52 nucleotide 정도인 효모 mRNA의 leader(5' 말단에서 개시 코돈까지의 지역)에 A nucleotide가 두드러지게 높은 비율로 존재하고(between the -25 and -1 position, 46%) 이에 반해 G nucleotide가 적은 비율로 존재하여(12%) G:C 염기 쌍에 의해 형성될 수 있는 안정된 stem-loop structure가 배제되어 있다는 점과 일맥상통한다(15).

이와 같은 secondary structure에 의한 단백질 합성개시의 억제정도 차이는 아마도 효모와 포유동물 cap-binding proteins 간의 다음과 같은 차이점에서 비롯되는 듯하다. 포유동물 세포의 cap-binding complex인 eIF-4F는 세 개의 단백질 인자 eIF-4E(24 kDa), eIF-4A(46 kDa)와 220 kDa subunit로 구성되어 있고 secondary structure를 풀 수 있는 RNA-helicase 활성을 지니고 있다(31). 이에 반해 효모의 세 가지 주된 cap-binding proteins은 24 kDa(eIF-4E), 96 kDa과 150 kDa이며(29, 55), 놀랍게도 효모 eIF-4A는 포유동물 eIF-4A와 65% 동일성을 보이는 상당한 유사성에도 불구하고 효모 eIF-4F complex의 일원으로 작용하지 않는다. 또한 효모 eIF-4A는 *in vivo*에서나 *in vitro*에서 포유동물 세포의 eIF-4A로 대체될 수 없어서(53) 두 system간의 cap-binding complex간에 구조 및 기능에 큰 차이점이 있음을 시사해주고 있다.

상기 언급한 효모 translation initiation의 특징은 포유동물 세포유래의 유전자를 효모에서 발현시키고자 할 때 반드시 유의해야 할 사항이다. 포유동물 세포에 비해 효모는 AUG 개시 코돈 주변의 consensus sequence에 대해 비교적 느슨한 선별을 보이기 때문에 발현시키고자 하는 외래 유전자의 개시 코

돈 앞에 다른 AUG 코돈이 존재하게 되면 원하는 유전자의 개시 코돈을 사용한 translation initiation이 크게 저하되어 그 발현효율은 현저하게 감소하게 된다. 또한 외래 유전자가 G-, C-, 또는 G+C가 높은 빈도로 존재하는 leader를 지녔거나, cDNA construction 과정에서 도입된 dyad symmetry를 형성할 수 있는 restriction sites를 지닌 경우에도 숙주세포 효모에서는 그 mRNA에 대한 translation initiation 효율이 크게 감소될 것이다.

**효모에서의 translation initiation 조절**

아미노산 결핍, heat shock 등과 같은 성장조건의 악화시 포유동물 세포는 전체적인 단백질 합성활동을 급격하게 감소시킨다. 이와 같은 전체 단백질 합성활동의 감퇴는 보편적인 단백질 합성 개시인자인 eIF-2의 인산화에 의해 매개된다(37). 인산화된 eIF-2는 guanine nucleotide exchange factor인 eIF-2B와 단단히 결합하여 eIF-2B 활성을 억제하게되어 더 이상의 새로운 단백질 합성 개시를 막게된다. 이와 유사한 단백질 합성 조절 기작이 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서도 작용하고 있어 외부 아미노산의 결핍을 극복하는 수단으로 이용됨이 최근의 연구 결과들로부터 밝혀졌다(51).

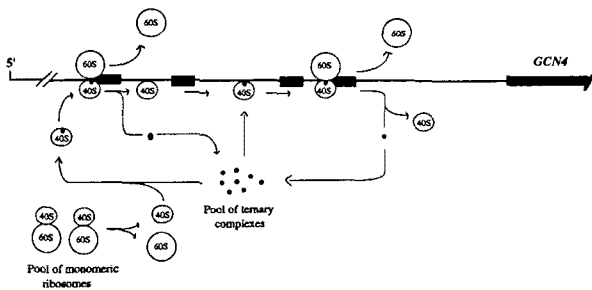
효모 GCN4는 아미노산 생합성에 관련되는 유전자들의 발현을 조절하는 positive transcription factor인데 배양액의 아미노산이 결핍되면 GCN4 mRNA의 양의 변화 없이 더 많은 양의 GCN4 단백질이 만들어지게 된다. GCN4 mRNA는 유달리 긴 591개의 nucleotide로 된 leader를 지녔는데, 그 leader안에 있는 4개의 짧은 upstream open reading frames(uORFs)을 통해 GCN4 mRNA의 translation이 조절된다(Fig. 2). Hinnebusch 연구팀의 정교한 실험들은 아미노산이 풍부할 때는 uORF1에서 translation을 마친 ribosome이 계속 uORF4에서 translation을 시작하고 마친 후에는 GCN4 mRNA에서 떨어져나와서 실제적인 GCN4 개시 코돈에서의 translation initiation은 매우 비효율적으로 일어남을 보여주었다(1). 그러나 아미노산이 결핍된 경우 ribosome의 활성이 변화되어 uORF1에서 translation을 마친 ribosome의 50%만이 uORF4에서 translation을 시작하고

나머지 50%는 GCN4 개시 코돈에서 translation을 시작하여 GCN4의 발현을 증가시키게 된다고 제안되었다. 최근의 연구 결과들은 이같은 ribosome의 활성변화에 보편적인 단백질 합성 개시인자들이 관련되어 있음을 보여주었다. 이들 결과에 기초하여 정립된 이론에 의하면 아미노산 결핍에 의해 축적된 uncharged tRNA가 직접적인 signal로 작용하여 protein kinase 활성을 지닌 GCN2를 활성화하여 eIF-2의  $\alpha$ -subunit를 인산화시키게 된다(21). 인산화된 eIF-2는 eIF-2-GDP를 eIF-2-GTP로 전환시키는 데 작용하는 eIF-2B의 활성을 억제하므로 새로운 단백질 합성개시에 필요한 ternary complex(eIF-2-GTP-tRNA<sub>i</sub>)의 형성을 저해한다. 따라서 아미노산 결핍시 uORF1의 translation을 마친 ribosome들 중 일부만이 ternary complex와 결합하여 uORF4에서 translation을 시작하게 되고 나머지 ribosome들은 leader 지역을 따라 좀더 내려가다가 ternary complex를 얻게 되어 GCN4의 개시 코돈에서 translation을 시작할 수 있게 된다. Ternary complex의 이용 가능성에 따라 ribosome이 GCN4의 실제 개시 코돈에서 translation initiation을 할 수 있는 효율이 결정되기 때문에 ternary complex 형성이나 ribosome-ternary complex 결합을 저해하게 되는 유전적 결합들은 비정상적인 GCN4 발현을 유발하게 된다. 이와 같은 translation initiation 조절 기작은 앞서 언급한 바와 같이 GCN4 발현 조절이 상실된 돌연변이주들에 대한 연구를 통해서 eIF-2 $\gamma$ , eIF-2B, eIF-3 등과 같은 여러 단백질 합성 개시인자들의 유전자들이 확보된 이유를 잘 설명해주고 있다.

GCN4외에도 효모에서는 CPA1의 발현도 translation initiation 단계에서 조절된다고 보고되었다. CPA1은 carbamoylphosphate synthetase의 small subunit을 암호하는 유전자로서 배양액의 arginine 농도에 따라 그 발현이 선택적으로 조정되는데, CPA1 mRNA의 leader에 있는 짧은 uORF에 의해 암호되는 25-amino-acid peptide가 translation repressor로 작용하여 CPA1의 발현을 조절한다고 추정된다(22). 그러나 배양 조건에 따른 CPA1 mRNA의 안정성 변화도 CPA1 발현 조절에 관련된다는 보고도 있다(20). 앞으로 효모 단백질 합성에 관한 활발한 연구를 통하여 translational control에 의해 유전자 발현이 조절되는 예가 더 많이 보고될 것으로 기대된다.

**맺는말**

효모 translation의 일부 특이성에도 불구하고, 효모와 포유동물의 단백질 합성 개시인자들의 아미노산 서열이 매우 유사하며 또한 많은 경우 이들은 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 상호 교환 가능하다는 사실들은 효모와 포유동물 세포의 translation initiation은 상당히 비슷한 기작을 통해 이루어짐을 입증하고 있다. 확보된 효모 개시인자들의 유전자 조작을 통해서 특정



**Fig. 2.** Regulation of GCN4 translation in *Saccharomyces cerevisiae*.

단백질 합성 개시인자가 결핍되거나 활성을 잃게된 변이주를 쉽게 얻게 되었다. 이들에 대한 분자유전학적 분석은 포유동물 세포를 연구대상으로 하여 축적되었던 단백질 합성 개시인자들의 기능 및 구조에 대한 기존의 정보를 검증해주었다. 또한 이러한 연구는 생체 내에서 이들의 실제적인 역할에 대해 보다 정확하고 상세한 정보를 제공하고 있다. 특히 효모 유전학의 이용은 단백질 합성에 관련될 것으로 사료되는 새로운 인자들의 발견 및 인자들간의 상호작용 기작에 대한 이해에도 크게 기여하고 있다. 효모 *in vitro* translation system을 이용한 생화학적 분석이 유전학적 분석과 병행됨에 따라 효모 단백질 합성 개 대한 연구결과 해석을 더욱 확장시켜 주고 있어 진핵세포의 간골 모델인 효모는 그 진가를 단백질 합성 개시과정에 대한 연구에서도 유감없이 발휘하고 있다. 효모에서 얻어진 이와 같은 연구결과들은 고등 진핵세포에서의 단백질 합성기작 및 조절에 대한 이해를 도모할 뿐만 아니라 외래 단백질의 효율적인 발현체계를 구축하는 데에도 유용하게 적용될 것이다.

## 참고문헌

1. Abastado, J. P., P. F. Miller, B. M. Jackson and A. G. Hinnebusch, 1991. Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 486-496.
2. Altmann, M., C. Handschin, and H. Trachsel, 1987. mRNA cap-binding protein: Cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 998-1003.
3. Altmann, M., P. P. Muller, J. Pelletier, N. Sonenberg, and H. Trachsel, 1989. A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**, 12145-12147.
4. Altmann, M., N. Sonenberg, and H. Trachsel, 1989. Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: Initiation factor 4E-dependent cell-free system. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4467-4472.
5. Altmann, M., P. P. Muller, B. Wittmer, F. Ruchti, S. Lanker and H. Trachsel, 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J.* **12**, 3997-4003.
6. Baim, S. B. and F. Sherman, 1988. mRNA structures influencing translation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1591-1601.
7. Barnes, C. A., M. M. MacKenzie, G. C. Johnston and R. A. Singer, 1995. Efficient translation of an *SSA1*-derived heat-shock mRNA in yeast cells limited for cap-binding protein and eIF-4F. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 619-627.
8. Benne, R., M. L. Brown-Luedi and J. W. B. Hershey, 1979. Purification and characterization of protein synthesis initiation factor eIF-1, eIF-4C, eIF-4D and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3070-3078.
9. Benne, R., H. Ames, J. W. B. Hershey, and H. O. Voorma, 1979. The activity of eukaryotic initiation factor eIF-2 in ternary complex formation with GTP and Met-tRNA. *J. Biol. Chem.* **254**, 3201-3205.
10. Blum, S., M. Miller, S. R. Schmid, P. Linder and H. Trachsel, 1989. Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: initiation factor 4A-dependent cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6043-6046.
11. Brenner, C., N. Nakayama, M. Goebel, K. Tanaka, A. Tah-e, and K. Matsumoto, 1988. *CDC33* encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3556-3559.
12. Bushman, J. L., A. I. Asuru, A. R. Matts and A. G. Hinnebusch, 1993. Evidence that *GCD6* and *GCD7*, translation regulator of *GCN4*, are subunits of the guanine nucleotide exchange factor for eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1920-1932.
13. Chakrabarti, A. and U. Maitra, 1991. Function of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of an 80S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J. Biol. Chem.* **266**, 14039-14045.
14. Chakravarti, D., T. Maiti and U. Maitra, 1993. Isolation and immunochemical characterization of eukaryotic translation initiation factor-5 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**, 5754-5762.
15. Cigan, A. M. and T. F. Donahue, 1987. Sequence and structural features associated with translation initiator regions in yeast—a review. *Gene* **59**, 1-18.
16. Cigan, A. M., E. K. Pabich and T. E. Donahue, 1988. Mutational analysis of the *HIS4* translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2964-2975.
17. Cigan, A. M., E. K. Pabich, L. Feng and T. F. Donahue, 1989. Yeast translation initiation suppressor *sui2* encodes the a subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2784-2788.
18. Cigan, A. M., M. Foiani, E. M. Hanning and A. G. Hinnebusch, 1991. Complex formation by positive and negative translational regulators of *GCN4*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3217-3228.
19. Coppolecchia R., P. Buser, A. Stotz and P. Linder, 1995. A new yeast translation initiation factor suppresses a mutation in the eIF-4A RNA helicase. *EMBO J.* **12**, 4005-4011.
20. Crabeel, M., R. Lavalley, and N. Glansdorff, 1990. Arginine-specific repression in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic data on *ARG1* and *ARG3* mRNA transcription and stability support a transcriptional control mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1226-1233.
21. Dever, T. F., L. Feng, R. C. Wek, A. M. Cigan, T. F. Donahue and A. G. Hinnebusch, 1992. Phosphorylation of

- initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell* **68**, 585-596.
22. Delbecq, P., M. Werner, A. Feller, R. K. Filipkowski, F. Messenguy and A. Pierard, 1994. A segment of mRNA encoding the leader peptide of the *CPA1* gene confers repression by arginine on a heterologous yeast gene transcript. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2378-2390.
  23. Dholakia, J. N. and A. J. Wahba, 1989. Mechanism of the nucleotide exchange reaction in eukaryotic polypeptide chain initiation. Characterization of the guanine nucleotide exchange factor as a GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 5134-5140.
  24. Donahue, T. F., A. M. Cigan, E. K. Pabidh and B. C. Valavicius, 1988. Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process. *Cell* **54**, 621-632.
  25. Feinberg, B., C. S. McLaughlin and K. Moldave, 1982. Analysis of temperature-sensitive mutants ts187 of *Saccharomyces cerevisiae* altered in a component required for the initiation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **251**, 10846-10851.
  26. Garcia-Barrio M. T., T. Naranda, C. R. Vazques de Aldana, R. Cuesta, A. G. Hinnebusch, J. W. Hershey and M. Tamame, 1995. *GCD10*, a translational repressor of *GCN4*, is the RNA-binding subunit of eukaryotic translation initiation factor3. *Genes Dev.* **9**, 1781-1796.
  27. Gasiior, E., F. Jerrera, I. Sadnki, C. S. McLaughlin and K. Moldave, 1979. The preparation and characterization of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **254**, 3965-3969.
  28. Goumans, H., A. Thomas, A. Verhoeven, H. O. Voorma and R. Benne, 1980. The role of eIF-4C in protein synthesis initiation complex formation. *Biochim. Biophys. Acta* **608**, 39-46.
  29. Goyer, C., M. Altmann, H. Trachsel and N. Sonenberg, 1989. Identification and characterization of cap-binding proteins from yeast. *J. Biol. Chem.* **264**, 7603-7610.
  30. Goyer, C., M. Altmann, H. S. Lee, A. Blanc, M. Deshmukh, J. L. Jr. Woolford, H. Trachsel and N. Sonenberg, 1993. *TIF4631* and *TIF4632*: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4860-4874.
  31. Grifo, J. A., S. M. Tahara, M. A. Morgan, A. J. Shatkin and W. C. Merrick, 1983. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **258**, 5804-5810.
  32. Grifo, J. A., R. D. Abramson, C. A. Satler and W. C. Merrick, 1984. RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* **259**, 8648-8654.
  33. Gupta, N. K., A. L. Roy, M. K. Nag, T. G. Kinzy and S. E. A. MacMillan, 1991. In Post-transcriptional control of gene expression (ed. J. McMarthy) pp.211-216. Berlin:Springer-Verlag.
  34. Guthrie, C. and G. R. Fink, 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Meth. Enzymol.* **194**, Academic Press, INC
  35. Hannig, E. M., A. M. Cigan, B. A. Freeman and T. G. Kinzy, 1993. *GCD11*, a negative regulator of *GCN4* expression, encodes the  $\gamma$  subunit of eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 506-520.
  36. Hartwell, L. H. and C. S. McLaughlin, 1968. Temperature-sensitive mutants of yeast exhibiting a rapid inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **96**, 1664-1667.
  37. Hershey, J. W. B. 1991. Translation control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 717-755.
  38. Hershey, J. W. B., Z. Smit-McBride and J. Schrier, 1990. The role of mammalian initiation factor eIF-4D and its hypusine modification in translation. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**, 160-162.
  39. Hinnebusch, A. G., 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 248-273.
  40. Ilan, J., 1987. Translational regulation of gene expression, Plenum press, N.Y. and London
  41. Kasperaitis, M. A., H. O. Voorman and A. A. Thomas, 1995. The amino acid sequence of eukaryotic translation initiation factor 1 and its similarity to yeast initiation factor SUI1. *FEBS Lett.* **365**, 47-50.
  42. Kang, H. A. and J. W. B. Hershey, 1994. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 3334-3340.
  43. Kozak, M., 1986. Influence of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2850-2854.
  44. Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
  45. Kozak, M., 1989, The scanning model for translation; an update. *J. Cell. Biol.* **108**, 229-241.
  46. Linder, P. and A. Prat, 1990, Baker's yeast, the new work horse in protein synthesis studies: Analyzing eukaryotic translation initiation. *BioEssays* **12**, 519-526.
  47. Linder, P. and P. P. Slonimski, 1989. An essential yeast protein, encoded by duplicated genes *TIF1* and *TIF2* and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2286-2290.
  48. Merrick, W. C., 1979. Assays for eukaryotic protein synthesis. *Meth. Enzymol.* **150**, 108-124.



49. Milburn, S. C., J. W. B. Hershey, M. V. Davies, K. Kelleher and R. J. Kaufman, 1990. Cloning and expression of eukaryotic initiation factor 4B cDNA: sequence determination identifies a common RNA recognition motif. *EMBO J.* **9**, 2783-2790.
50. Naranda, T., S. E. MacMillan and J. W. Hershey, 1994. Purified yeast translational initiation factor eIF-3 is an RNA-binding protein complex that contains the *PRT1* protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32286-32292.
51. Pain, V. M., 1994. Translation control during amino acid starvation. *Biochimie.* **76**, 718-728.
52. Petersen, N. S. and C. S. McLaughlin, 1973. Monocistronic messenger RNA in yeast. *J. Mol. Biol.* **81**, 33-45.
53. Prat, A., S. R. Schmid, P. Buser, S. Blum, H. Trachsel, P. J. Nielsen and P. Linder, 1990. Expression of translation initiation factor 4A from yeast and mouse in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**, 140-145.
54. Roy, A. L., D. Chakarbartii, B. Datta, R. E. Hilemann, and N. K. Gupta, 1988. Natural mRNA is required for directing Met-tRNA(f) binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry* **27**, 8203-8209.
55. Rozen, F., I. Edery, K. Meerevitch, T. E. Dever, W. C. Merrick and N. Sonenberg, 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1134-1144.
56. Russell, D. W. and L. L. Spremulli, 1979. Purification and characterization of a ribosome dissociation factor (eukaryotic initiation factor 6) from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **254**, 8796-8800.
57. Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang and J. W. B. Hershey, 1991. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3105-3114.
58. Sonenberg, N., 1988. Cap-binding proteins of eukaryotic messenger RNA; functions in initiation and control of translation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **35**, 173-207.
59. Sripati, C. E., Y. Groner and J. R. Warner, 1976. Methylated blocked 5' termini of yeast mRNA. *J. Biol. Chem.* **251**, 2898-2904.
60. Vega Laso, M. R., D. Zhu, F. Sogliocco, A. J. Brown, M. F. Tuite and J. E. McCarthy, 1993. Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.* **268**, 6453-6462.
61. Wei, C. L., M. Kainuma and J. W. Hershey, 1995. Characterization of yeast translation initiation factor 1A and cloning of its essential gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 22788-22794.
62. Williams, N. P., A. G. Hinnebusch and T. F. Donahue, 1989. Mutations in the structural genes for eukaryotic initiation factors 1 alpha and 2 beta of *Saccharomyces cerevisiae* disrupt translational control of *GCN4* mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7515-7519.
63. Yoon, H. and T. F. Donahue, 1992. The *sui1* suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> recognition of the start codon. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 248-260.
64. Yoon, H., S. P. Miller, E. K. Pabich and T. F. Donahue, 1992. SSL1, a suppressor of a *HIS4* 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast. *Genes Dev.* **6**, 2463-2477.