

Yeast two-hybrid system을 활용한 단백질 상호작용 조절 저분자 물질 탐색

권호정* · 김민정

세종대학교 생명공학과

개요

세포내에서 일어나는 신호전달, 세포 주기, 분화, DNA 복제 및 전사, 번역, 대사등 거의 모든 반응들은 수많은 단백질의 상호작용을 통해 수행되고 조절되어진다. 즉 cellular process의 이해는 이들의 조절에 관련되는 주요 단백질과 이들 복합체를 구성하는 단백질간의 상호작용을 분석하여 각각의 기능을 밝히고 상대적인 관계를 규명하는데 있다. 따라서 기존에 알려진 단백질과 상호 작용하는 새로운 단백질을 찾아내어 알려진 단백질들과의 관계를 밝혀 세포 내에서의 생화학적 현상과 기전을 연구하는 것은 현대 생화학, 분자 생물학의 주요한 연구 대상이 되고 있다.

단백질간의 상호작용을 연구하는데 있어서 yeast two hybrid system은 효과적인 실험방법이라고 할 수 있다. Two hybrid는 이미 알고 있는 두 단백질간의 상호작용을 확인하고자 할 경우나 이미 알고 있는 단백질과 상호 작용하는 또 다른 단백질을 스크리닝 하고자 할 때 사용할 수 있다. 이 system은 세포 내에서 작용하게 됨으로써 단백질의 구조 변형 없이 약한 상호작용도 확인할 수 있는 장점이 있다. Two hybrid로 확인된 단백질간의 상호작용은 직접 생물학적 기능과 연관시킬 수 있으며 물리적 상호작용을 저해하는 물질은 실제 세포 내에서의 이들 단백질의 기능에 영향을 줄 것으로 예측할 수 있다. 실질적으로 세포 내에서는 다양한 단백질들이 거대한 complex를 이루어 기능을 수행하는 만큼 이들 complex를 조절하는 것은 각각의 단백질들의 활성을 조절하는 방식과는 달리 보다 선택적으로 복합 단백질의 기능을 조절할 수 있는 방법을 제시 할 수 있다. 또한 two hybrid를 이용할 경우 직접 상호작용에 관여하는 단백질내의 motif나 domain을 사용함으로써 단백질의 상호작용에 관여하는 특정부분을 조절하는 새로운 물질을 검색하는데도 이용할 수 있다.

본 총설에서는 특정 단백질의 상호작용에 중요한 motif나 domain을 사용하여 이들의 상호작용을 효율적으로 조절할 수 있는 검색계로 효모의 two-hybrid system을 사용한 cell based assay system구축방법의 최근 동향을 소개하고 유전자 발현 조절 corepressor complex 및 신호 전달계에서 단백질 상호작용

을 조절할 수 있는 검색계 구축을 사례로 설명하고자 한다.

원리

Yeast two-hybrid assay는 많은 eukaryotic trans-acting transcriptional regulator들이 독립적인 기능을 수행하는, 물리적으로 분리된 domain으로 구성되어졌다는 사실에 착안하여 이루어진 system이다. 이 regulator들은 특정 염기 서열로 이루어진 promoter 부위와 결합하는 DNA-binding domain과 RNA polymerase II 복합체와 직접적으로 작용하여 transcription에 관여하는 기능을 수행하는 activation domain으로 구성되어 있다. 이들 각 domain은 하나의 단백질을 구성하여 특정 유전자를 발현시킬수 있는 기능을 수행하게 된다.

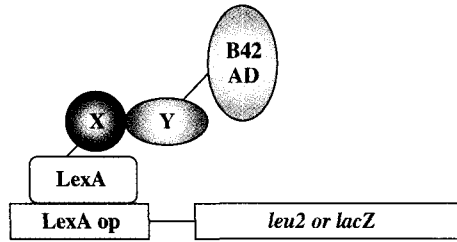
DNA-binding domain과 activation domain은 recombinant DNA technology를 통해 물리적으로 분리하여 하나의 host내에서 별도로 발현시킬 수 있는데 이 때 이들은 서로 분리되어 있으므로 결합하여 유전자를 발현시킬 수는 없게 된다. 그러나 상호작용이 가능한 두 단백질을 각기 DNA binding domain의 유전자와 activation domain의 유전자에 결합시켜 효모에 도입해 발현시키면 두 단백질의 상호작용에 의해 분리되었던 DNA binding domain과 activation domain이 전사와 관련된 기능을 하게 됨으로써 유전자 발현이 가능해 진다.

Yeast two-hybrid system으로 Field & Song(1989)에 의해 최초로 개발된 GAL4를 이용한 two hybrid system의 경우는 yeast의 GAL4 transcription factor의 DNA-binding domain과 activation domain을 분리하여 발현되도록 하고 reporter gene(*lacZ*)의 promoter upstream에 GAL4 upstream activation sequence(UAS)가 존재하도록 하였다.

GAL4 system다음으로 개발된 LexA system은 *E.coli*의 SOS gene의 repressor로 기능하는 LexA 단백질을 DNA-binding domain으로 이용하고 yeast에서 transcription기능을 할 수 있는 *E.coli*의 B42 단백질을 activation domain으로 도입하였다. 이 경우 *lacZ* reporter gene의 upstream에는 LexA operator가 존재하게 된다(Fig. 1).

이들 system을 통해서 상호 작용하는 두 단백질을 각각의

A. LexA two hybrid system



B. GAL4 two hybrid system

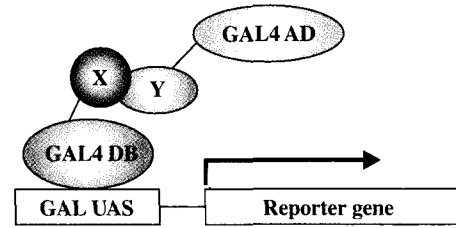


Fig. 1. LexA or GAL4 based yeast two-hybrid system.

domain과 함께 발현시키게 되면 GAL4 DNA-binding domain 이나 LexA가 DNA상에 위치하게 되고 이들과 하나의 형태로 발현된 단백질은 activation domain과 발현된 단백질과 결합하여 reporter gene인 *lacZ*가 발현되어 실제로 yeast cell내에서 두 단백질이 상호작용하고 있음을 볼 수 있게 된다.

GAL4 system과는 달리 LexA system은 yeast의 inducible *GAL1* promoter를 사용하여 galactose에 의해 activation domain의 fusion 단백질의 발현을 조절받을 수 있게 되어있는데 이는 외래의 단백질이 yeast cells내에서 toxic하게 작용할 수 있는 가능성을 줄인 장점이라 할 수 있다. 또한 *lacZ* reporter gene이 yeast cell의 genome에 one copy로 존재하는 것이 아니라 high copy number plasmid상에 존재하여 X-gal이 포함된 배지에서 β -galactosidase activity를 쉽게 확인할 수 있는 장점이 있는 반면 false positive의 가능성이 높아질 문제가 있을 수도 있다.

한편 기존에 알려진 two-hybrid와는 달리 두 단백질의 상호작용을 통하여 reporter gene의 발현이 억제되는 reverse two-hybrid system도 단백질의 상호작용을 저해하는 물질의 검색에 유용하게 사용할 수 있다.

즉 기존의 LexA와 GAL4 two hybrid system을 이용한 단백질 상호작용 저해제 검색은 저해제에 의해 reporter 유전자의 활성이 발현되지 않아 균의 생육이 억제됨으로 이른바 negative selection이 된다. 이 경우 검색 샘플의 효모에 대한 특성으로도 같은 효과가 유발됨으로 wild type yeast를 사용하여 검색샘플의 독성 유무를 확인해야 하는 필요가 있다. 반면 reverse two hybrid system의 경우 두 단백질 상호작용의 저해에 의해 reporter gene의 발현이 억제 되면 효모의 생육이 촉진되므로 positive selection이 되어 wild type yeast에 대한 특성 test를 거치는 번거로움이 없다.

Reverse two-hybrid system에서 두 단백질을 발현시키기 위한 vector는 각각 glucose에 의해 억제되고 galactose에 의해 유도되는 *GAL1* promoter의 조절을 받게되고 단백질간의 상호작용이 있어 reporter gene인 *URA3*가 발현되는 cell들은 pro-toxin 5-fluoroorotic acid(5-FOA)가 존재할 경우 성장할 수 없다. 만약 이들 두 단백질의 상호작용을 저해할 수 있는

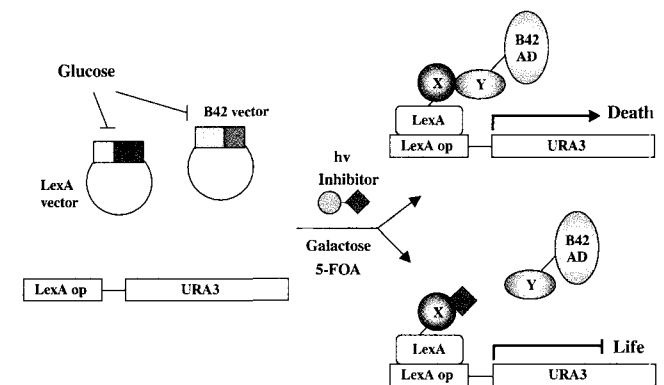


Fig. 2. Reverse two-hybrid system.

물질이 있게되면 *URA3* gene의 발현이 억제되어 cell이 성장할 수 있게 된다(Fig. 2).

실례로 Huang & Schreiber는 이 system을 이용하여 activin receptor R1과 immunophilin FKBP12의 결합되면 cell이 증식·억제 상호작용을 저지하는 물질인 FK506을 처리하게 되면 yeast cell이 성장하는 것을 보여주었다(Huang *et al.*, 1997).

연구 방법

1. Yeast two-hybrid system을 위한 plasmid

LexA 단백질의 DNA binding domain을 가지는 plasmid는 auxotrophic marker로 *HIS3*를 그리고 B42의 activation domain이 있는 plasmid에는 *TRP1*을 auxotrophic marker로 가지고 있다. 일반적인 LexA를 갖는 plasmid는 pLexA/pEG202로 yeast ADH1 promoter를 통해 발현되며 LexA binding domain과 nuclear localization signal을 가지고 있다. 또한 가장 널리 이용되고 있는 B42 domain을 갖는 것은 pB42AD/pJG4-5로서 SV40 nuclear localization signal과 hemagglutinin으로부터 유래된 epitope tag 및 yeast가 galactose에서 성장할 수 있도록 yeast *GAL1* promoter를 가지고 있다. 이 *GAL1* promoter는 galactose 의존적으로 작용하기 때문에 많은 false positive를 제거하는데 이용된다. 상호작용의 확인은 *LEU2*와 *lacZ*의 두 개 리포터 유전자를 사용하

는데, *LEU2* 리포터는 yeast genome내에 삽입되어져 있으며 upstream에 LexA binding site를 가지고 있고, *lacZ* reporter는 URA3 maker를 가지는 2 μ plasmid에 위치해 있다.

2. Yeast transformation

1) 시약

i. Yeast 배지

- a. YPD medium; 20g/L Difco peptone
10g/L yeast extract
20g/L agar
pH는 5.8로 맞춘다. 멸균한 후 55°C정도로 식힌 후 2%가 되도록 20% dextrose나 glucose stock solution을 넣는다.
- b. SD medium; 6.7g/L yeast nitrogen base without amino acid
20g/L agar
100ml 10 \times dropout solution
pH는 5.8 멸균한 후 55°C정도로 식힌 후 2%가 되도록 dextrose나 glucose를 넣는다.
- c. 10 \times Dropout solution;
L-Isoleucine(300mg/L)
L-Valine(1500mg/L)
L-Adenine hemisulfate salt(200mg/L)
L-Arginine HCl(200mg/L)
L-Histidine HCl monohydrate(200mg/L)
L-Leucine(1000mg/L)
L-Lysine HCl(300mg/L)
L-Methionine(200mg/L)
L-Phenylalanine(500mg/L)
L-Threonine(2000mg/L)
L-Tryptophan(200mg/L)
L-Tyrosine(300mg/L)
L-Uracil(200mg/L)
Dropout solution은 각 transformation시에 필요한 배지의 amino acid marker를 제외한 것으로 준비하여 사용한다.
- d. SD/Gal/Raf/X-gal plates; SD 배지를 준비하여 pH를 맞추지 않고 autoclave한 후 배지가 55°C정도로 식으면 2% galactose, 1% raffinose, 10 \times BU salt, 20 μ g/ml X-gal을 넣는다.
- e. 10 \times BU salts(pH 7)
70g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O
30g/L NaH₂PO₄
- ii. Herring testes carrier DNA: high-quality carrier DNA;

- (Nicked calf thymus DNA는 사용하지 않는 것이 좋다.)
- iii. sterile TE/LiAc
 - iv. TE buffer or sterile, distilled H₂O
 - v. sterile PEG/LiAc solution(40% PEG solution); 10ml 일 경우 50% PEG3350 8ml , 10 \times TE buffer(0.1M Tris-Cl, 10mM EDTA, pH7.5) 1ml, 1M LiAc(pH 7.5) 1ml
 - vi. 100% DMSO

2) 실험 방법

- ① EGY48[p8op-lacZ]cell을 선택배지에서 250rpm인 30°C 진탕 배양기에서 24시간 배양한다.
- ② 자란 세포를 300ml 선택배지로 옮겨 OD₆₀₀ >0.6정도로 250rpm인 30°C 진탕 배양기에서 배양한다.
- ③ 자란 세포를 원심 분리하여 회수한 후 50ml정도의 TE buffer(pH7.5)나 멸균된 증류수를 넣고 섞는다.
- ④ 원심분리 한 후 1.5ml LiAc/TE buffer를 넣고 잘 섞는다.
- ⑤ Competent cell 100 μ l에 10 μ g/ml의 carrier DNA, 5 μ g의 형질 전환을 위한 DNA를 넣는다. 만든 yeast competent cell은 곧바로 사용하는 것이 좋다.
- ⑥ 여기에 600 μ l의 40% PEG4000용액을 섞어 250rpm, 30°C의 진탕 배양기에서 30분간 배양한다.
- ⑦ 배양한 반응물에 70 μ l DMSO를 넣고 잘 섞는다. 이때 vortex는 되도록 피한다.
- ⑧ 반응물을 42°C에서 15분간 heat shock을 가한다
- ⑨ 반응액에서 세포만을 얻어 500 μ l의 TE buffer(pH7.5)를 넣고 그 중 100 μ l를 SD 선택 배지에 분주해 30°C 배양기에서 3-4일간 배양한다.
- ⑩ Repoter gene 발현의 확인을 위해서 자란 형질 전환체들을 Uracil, Histidine, Tryptophan, Leucine이 없는 SD/Gal/Raf/X-gal plates로 옮겨 30°C 배양기에서 3-4일간 배양한다.

2. Beta galactosidase assay(paper disc plate)

- ① 자란 형질 전환체들을 Uracil/Histidine/Tryptophan/Leucine이 없는 SD/Gal/Raf 액체 배지에서 배양한다.
- ② SD/Gal/Raf/X-gal plates를 붓기전에 배지에 2% 배양한 세포와 0.001% SDS를 함께 섞어 plate를 만든다.
- ③ Paper disc에 검색 sample을 40 μ 씩 injection한 후 plate 1개 당 9개의 paper disc를 놓는다.
- ④ 30°C 배양기에서 24-48시간 동안 배양한다.
- ⑤ Paper disc 주위에 leucine reporter gene 및 β -galactosidase reporter gene의 expression을 통한 고밀도의 균생육과 푸른색 강도로 interaction의 저해 및 활

성화시키는 물질을 찾아낼 수 있다.

- ⑥ 시료의 효모에 대한 독성에 의해 paper disc 저해환을 나타낼 수 있으므로 활성을 나타낸 시료를 대상으로 wild type yeast에 대한 생육억제 활성 실험을 할 필요가 있다.

3. Beta galactosidase assay

(Liquid culture assay using ONPG as substrate)

1) 시약

i. Z-buffer(pH 7.0)

Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	16.1g/L
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.5g/L
KC	10.75g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.246g/L

ii. Z-buffer(100ml)+β-mercaptoethanol(0.27ml)

iii. 4mg/ml ONPG in Z buffer(사용전에 미리 30°C에서 1-2시간 동안 녹여 둔다)

iv. 1M Na₂CO₃

v. Liquid nitrogen

2) 실험 방법

- ① SD selection medium 에 assay 하고자 하는 cell를 접종하여 30°C에서 overnight 으로 진탕 배양한다.
- ② 이 overnight culture 2ml을 8ml의 SD induction medium으로 옮겨 OD₆₀₀ = 0.5-0.8이 되도록 배양한다. 이때 검색 sample을 넣고 함께 배양한다. 이 배양액의 OD₆₀₀ 값을 측정한다.
- ③ 1.5ml의 cell을 microtube에 넣고 centrifugation하여 얻고 여기서 상층액은 버리고 1.5ml의 Z buffer를 넣고 cell을 centrifugation한다.
- ④ 다시 상층액을 버리고 300μl의 Z buffer를 넣고 cell을 잘 섞는다.
- ⑤ 100μl의 cell을 취해서 새 tube에 넣고 liquid nitrogen에 cell이 들어있는 tube를 30초간 넣었다가 37°C로 옮기기를 2번정도 반복한다.
- ⑥ 이렇게 cell을 썬후 여기에 β-mercaptoethanol이 들어간 Z buffer를 0.7ml 넣고 미리 30°C에서 1-2시간 동안 녹여 두었던 4mg/ml ONPG를 160μl 첨가한다.
- ⑦ 30°C incubator에서 반응시키고 색이 변할때까지의 시간을 확인한다.
- ⑧ 반응물의 색이 노란색으로 변하면 1M Na₂CO₃을 0.4ml 넣고 10분간 centrifugation한다.
- ⑨ 상층액의 OD₄₂₀ 값을 측정한다.

β -galactosidase unit = 1,000 × OD₄₂₀ / (t × V × OD₆₀₀)

t = elapsed time(in min) of incubation

V = 0.1 × concentration factor

OD₆₀₀ = A₆₀₀ of 1ml culture

연구 사례

1. 세포 신호전달계 인자인 Hsp90 결합 조절 물질로서 radicicol의 발견

① Radicicol의 Ras와 Raf-1의 결합 저해 활성

ras proto-oncogene은 mitogenic signal-transduction pathway의 핵심으로 cell cycle이 G0에서 S phase로 진행하는데 중요한 역할을 한다(Feramisco *et al.*, 1984). Raf-1은 serine/threonine kinase로 본 단백질의 N-terminal domain은 Ras가 active 상태에서 직접적으로 결합하는 것으로 알려져 있다(Avruch *et al.*, 1994).

따라서 Ras/Raf 결합에 대한 특이적인 저해제는 Ras가 활성화된 암세포의 증식 신호를 선택적으로 차단할 수 있는 치료제로 개발이 가능할 것이다.

이와 같은 가정하에 Ras/Raf의 protein-protein interaction에 작용할 수 있는 저해제 검색에 yeast two-hybrid system이 사용되었다. 이 system을 이용해 다양한 microbial metabolite를 대상으로 Ras/Raf 결합에 대한 저해제를 paper disc 방법으로 검색한 결과 "radicicol"을 얻을 수 있었다(Ki *et al.* 1998).

Radicicol은 fungus인 *Monosporium bonorden*으로부터 생성되는 antifungal anti-biotic으로 이미 v-src, v-ras 등의 oncogene에 의한 morphological transformation을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kwon *et al.*, 1992; Kwon *et al.*, 1997). 본약제에 의한 세포내 Ras/Raf 결합 저해활성은 이같은 세포 활성화에 대한 분자 기전 규명에 결정적인 기여를 하였다. 흥미롭게도 radicicol은 Ras/Raf의 결합을 직접적으로 저해하지 않고 Raf와 결합하여 안정성을 증가시키는 Hsp90와 먼저 결합함으로써 Raf의 세포내 분해를 촉진시켜 이 같은 활성을 발휘하는 것이 밝혀졌다(Schulte *et al.*, 1998). 이는 세포신호 증식 전달에 있어 단백질 complex형성의 중요성 및 저분자 유기화합물을 이용하여 이들의 조절이 실제로 가능하다는 것을 보여주는 좋은 예이다.

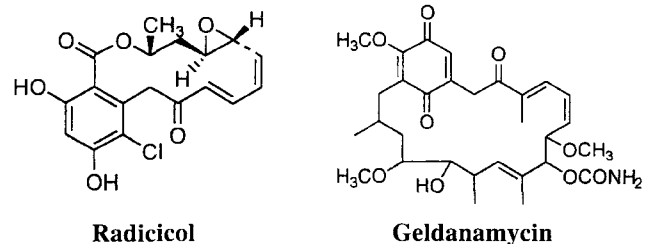


Fig. 3. Radicicol과 geldanamycin의 화학 구조식.

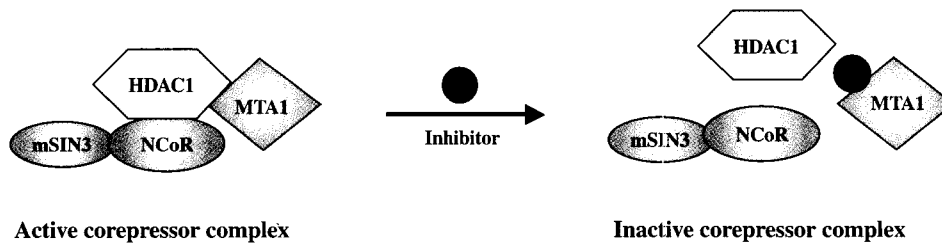


Fig. 4. Transcription repressor complex 형성에 관여하는 단백질-단백질 상호작용 저해제에 의한 complex 형성억제 모식도.

② Radicicol의 aminoacyl-tRNA synthetase complex 형성 저해 활성

Aminoacyl-tRNA synthetase는 최소 8개의 다른 polypeptide와 3개의 다른 단백질로 구성된 거대한 복합체로, 이것이 기능을 수행할 수 있는 완전한 complex를 이루기 위해서는 molecular chaperone이 필요할 것으로 추측되어졌다(Rho *et al.*, 1999, Cruiat *et al.*, 1999, Hemmingsen, 1998).

Yeast two-hybrid screening을 통하여 glutamyl-prolyl-tRNA synthetase가 molecular chaperone으로 단백질의 folding과 maturation에 관여하는 hsp90과 작용한다는 것을 확인하였다.

이들 두 단백질의 상호작용을 확인한 yeast two-hybrid system에 hsp90의 저해제인 radicicol과 geldanamycin을 처리한 경우 hsp90과 glutamyl-prolyl-tRNA synthetase간의 interaction에 의한 *leu2* reporter gene의 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 반면 histone deacetylase의 활성 저해제인 trichostatin A에 의해서는 두 단백질의 interaction이 저해되지 않아 reporter gene이 발현되었다(Kang *et al.*, 2000).

이것은 거대 단백질 복합체인 aminoacyl-tRNA synthetase 내의 단백질들간의 결합 조절에 관여하는 molecular chaperone인 hsp90의 저해를 통해 aminoacyl-tRNA synthetase 복합체 형성도 저해할 수 있다는 것을 보여주는 실례로서 거대 단백질 복합체를 형성하는 구성 단백질간의 상호작용을 저분자 유기화합물을 사용하여 저해할 수 있다는 가능성을 보여주는 예라고 할 수 있다.

2. Transcription repressor complex의 기능 저해제 탐색

Chromatin구조 내에서 histone은 DNA를 안정화시키고 package하는 역할뿐 아니라 acetylation과 deacetylation을 통해 transcription의 조절에서도 중요한 역할을 한다.

유전자 발현 억제 인자인 histone deacetylase(HDAC)는 RB, mSin3a, N-CoR과 같은 corepressor들과의 상호 작용을 통해 repressor complex의 일부로 chromatin 구조를 이루고 있는 histone 단백질을 탈아세틸화함으로써 유전자의 발현을 억제하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Hassig *et al.*, 1997; Alland *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998)

생물산업

한편 HDAC은 유방암의 전이에 관여하는 MTA I (Metastasis associated protein I)이라는 단백질과 상호 작용한다는 것이 밝혀졌는데(Tong *et al.*, 1998) MTA I protein은 사람의 유방암 세포 내에서 고 발현되어져 있는 것으로 알려져 있다(Toh *et al.*, 1994). HDAC 또한 암세포 및 저산소증과 같은 특정 생리조건에서 많은 양이 발현되어지고 있다. 암세포 내에서 HDAC은 corepressor와 함께 tumor suppressor gene들의 발현을 억제하고 있는 것으로 추측되어지고 있는데 MTA I의 경우 특이적으로 유방암 전이시 고 발현되어 HDAC과 결합하므로 이들의 결합을 억제하는 물질을 검색할 경우 RB, mSin3a, N-CoR와 같은 일반적인 repressor들과의 결합을 저해하는 것보다 전이성 암의 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

현재 본 연구실에서는 yeast two-hybrid system을 통하여 HDAC과 MTA I간의 상호 작용을 살펴보고 두 단백질의 결합하는 특정 부위를 확인하였으며 본 결과를 활용하여 HDAC 효소 활성을 저해하지 않으나 HDAC의 단백질 효소 활성에 요구되는 특정 complex의 구조 형성을 파괴함으로써 HDAC complex의 기능을 저해하는 새로운 개념의 저분자 물질 개발에 대한 연구를 수행중이다.

3. $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 와 retinoid X receptor의 작용촉진제인 retinoic acid

$\text{NF}\kappa\text{B}$ 의 inhibitor인 $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 와 상호작용하는 단백질을 yeast two hybrid system을 통하여 screening한 결과 retinoid X receptor를 얻을 수 있었다.

$\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 와 retinoid X receptor가 발현된 yeast two hybrid system에 retinoid X receptor의 ligand인 9-cis-RA를 처리하게 되면 reporter gene의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있다(Na *et al.*, 1998).

본 결과는 상술한 radicicol, FK506의 경우와는 달리 저분자 유기화합물에 의해 두 단백질의 상호작용이 증가되는 경우로서 세포내 단백질-단백질간의 상호작용이 분자량 1000이하의 유기화합물이 작용할 수 있는 극히 특정부분의 motif에 의해 조절될 수 있음을 시사한다.

이상의 연구실례에서 살펴보았듯이 효모를 이용한 단백질 상호작용 조절물질 검색은 생체 기능 조절 저분자 물질 개발을

위한 중요한 수단으로 앞으로 그 활용이 더욱 증가할 것이다.

참고 문헌

- Alland, L., Muhle, R., Hou, Jr., H., Potes, J., Chln, L., Schrelber-Agus, N., and DePinho, R. A., Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression, *Nature*, **387**: 49-55, 1997.
- Avruch, J., Zhang W., and Kyriakis, J. M., Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway, *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 279-283, 1994.
- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., and Sweet, R. W., Microinjection of the oncogene form of the human H-ras(T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells, *Cell*, **38**: 109-117, 1984.
- Field, S., and Song, O., A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-247, 1989.
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Bilin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E., Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A, *Cell*, **89**: 341-347, 1997.
- Huang, J., and Schreiber, S. L., A yeast genetic system from selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **941**: 3396-13401, 1997.
- Kang, J., Kim T., Ko, Y. G., Rho, S. B., Park, S. G., Kim M. J., Kwon, H. J., and Kim, S., Heat shock protein 90 mediates protein-protein interactions between human aminoacyl-tRNA synthetases, *J. Biol. Chem.*, **275**: 31682-31688, 2000.
- Ki, S. W., Kasagara, K., Kwon, H. J., Eishima, J., Takesako, K., Cooper, J. A., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Identification of radicicol as an inhibitor of in vivo Ras/Raf interaction with the yeast two-hybrid screening system. *J. of Antibiot.*, **51**: 963-944, 1998.
- Kwon, H. J., M. Yoshida, Y., S. Horinouchi, and T. Beppu, Potent and specific inhibition of p^{60v-src} protein kinase both in vivo and in vitro by radicicol., *Cancer Res.*, **52**: 6926-6930, 1992.
- Kwon, H. J., Yoshida, M., Nagaoka, R., Obinata, T., Beppu, T., Horinouchi, S., Suppression of morphological transformation by radicicol is accompanied by enhanced gelsolin expression, *Oncogene*, **15**: 2625-31, 1997
- Luo, R. X., Postigo, A. A., Dean, D. C., Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription, *Cell* **92**: 463-473, 1998.
- Matchmaker LexA two hybrid system user manual. Clontech.
- Na, S. Y., Kim, H., *et al.*, I κ B β interacts with the retinoid X receptor and inhibits retinoid dependent transactivation in lipopolysacchride-treated cells, *J. Biol. Chem.*, **273**: 3212-3215, 1998.
- Rho, S. B., Kim, M., J., Lee, J. S., Seol, W., Montegi, H., Kim, S., and Shiba, K., Genetic dissection of protein-protein interactions in multi-tRNA synthetase complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4488-4493, 1999.
- Schulte, T. W., Akinaga, S., Soga, S., Sullivan, W., Stensgard, B., Toft, D., Neckers, L. M., Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin, *Cell stress chaperones*, **3**: 100-108, 1998.
- Toh, Y., Pencil, S. D., and Nicolson, G., L., A novel candidate metastasis-associated gene, mta 1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines, *J. Biol. Chem.*, **269**: 22958-22963, 1994.
- Tong, J. K., Hassig, C. A. *et el.*, Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex, *Nature*, **395**: 917-921, 1998.