

효모에서 Hrq1과 Rad14의 상호작용에 대한 연구

민문희¹ · 김민지¹ · 최유진² · 유민주² · 김유라² · 안효빈² · 김채현² · 권채연² · 배성호^{1*}

¹인하대학교 자연과학대학 생명과학과, ²학익여자고등학교

Characterization of Hrq1-Rad14 Interaction in *Saccharomyces cerevisiae*

Moon-Hee Min¹, Min-Ji Kim¹, You-Jin Choi², Min-Ju You², Uy-Ra Kim², Hyo-Bin An²,
Chae-Hyun Kim², Chae-Yeon Kwon², and Sung-Ho Bae^{1*}

¹Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

²Hakik Girls' High School, Incheon 402-040, Republic of Korea

(Received March 24, 2014 / Accepted May 29, 2014)

Hrq1 is a novel member of RecQ helicase family, found in fungal genomes by bioinformatics analyses. It is most homologous to human RECQL4 and recent genetic and biochemical studies suggested that it may play roles in the maintenance of genome stability. In this study, we investigated yeast two-hybrid interactions between Hrq1 and the yeast genes homologous to the human genes that are known to interact with RECQL4. Among the 11 genes tested, Rad14, a nucleotide excision repair (NER) factor, was found to interact with Hrq1. In addition, pull-down assay with the purified proteins revealed direct protein-protein interaction between Hrq1 and Rad14. The yeast two-hybrid interaction was enhanced by the DNA damage induced by 4-nitroquinoline-1-oxide, which was dependent on the presence of Rad4, a key NER factor. These results suggest that Hrq1 may function in NER through interaction with Rad14.

Keywords: Hrq1, nucleotide excision repair, Rad4, Rad14, RecQ helicase, RECQL4 orthologue

DNA 수선과정의 일종인 nucleotide excision repair (NER) 경로는 모든 생물체에 잘 보존되어 있으며, 자외선과 같이 DNA 이중나선 구조의 뒤틀림을 유발하는 다양한 DNA 손상을 수선할 수 있는 기작이다(Prakash and Prakash, 2000). NER은 DNA 손상을 인식하는 방법에 따라 global genome repair (GGR)와 transcription-coupled repair (TCR)의 두 가지 경로로 나누어진다. 이 두 경로는 DNA 손상을 인식하는 초기 단계에서는 일련의 서로 다른 단백질들이 관여하지만, 그 이후에는 DNA 손상확인, 이중나선 풀기, 손상된 가닥 자르기 등의 공통된 단계들을 거친다(Prakash and Prakash, 2000; Compe and Egly, 2012).

효모에서 GGR 또는 TCR에 의해 DNA 손상이 인식되면 Rad4 (인간 XPC의 orthologue)가 손상된 DNA 부위에 결합하여 공통 수선과정을 촉진한다. 손상된 DNA에 결합한 Rad4는 다음으로 전사개시 인자인 TFIIF를 끌어들이고(Riedl *et al.*, 2003; Lafrance-Vanasse *et al.*, 2013). TFIIF 복합체에는 helicase인 Rad25와 Rad3 (각각 인간 XPC와 XPD의 orthologue)가 포함되어 있는데, 이들은 DNA 손상부위를 확인하고 여는 역할을 한다. 그 다음으로 또 다른 손상된 DNA 결합단백질인 Rad14 (인

간 XPA의 orthologue)과 RPA 등이 결합하여 pre-incision 복합체를 형성한다(Mardiros *et al.*, 2011; Compe and Egly, 2012). Rad14과 RPA는 pre-incision 복합체를 안정화시키고 NER 특이적 endonuclease인 Rad1-Rad10 복합체(인간 XPF-ERCC1의 orthologue)와 Rad2 (인간 XPG의 orthologue)를 끌어들이는 등 NER에서 매우 중요한 역할을 한다. Rad1-Rad10 복합체와 Rad2는 각각 손상 부위의 5' 쪽과 3' 쪽을 자른다(Guzder *et al.*, 2006; Tsodikov *et al.*, 2007; Mardiros *et al.*, 2011).

대장균의 RecQ helicase에서 그 이름을 따온 RecQ helicase family는 모든 생물체에 잘 보존되어 있으며 유전체의 안정성을 유지하기 위하여 다양한 역할을 한다. 이 효소는 상동재조합과 DNA 수선과정의 여러 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다(Chu and Hickson, 2009; Bernstein *et al.*, 2010). 인간에는 5가지 RecQ helicase (RECQL1, BLM, WRN, RECQL4, 그리고 RECQL5)가 있으며, 이중에서 BLM, WRN, RECQL4는 각각 인간의 희귀 유전질환인 Bloom syndrome, Werner syndrome, Rothmund-Thomson syndrome의 원인 유전자로 알려져 있다. 이 유전질환들은 유전체 불안정성의 증가로 인한 암 소인의 증가와 조기노화라는 공통점을 갖는다(Bohr, 2008). 고등진핵생물과는 달리 박테리아와 하등진핵생물은 하나의 RecQ helicase만을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Ashton and Hickson, 2010;

*For correspondence. E-mail: sbae@inha.ac.kr; Tel.: +82-32-860-7712; Fax: +82-32-874-6737

Table 1. Candidate genes interacting with *HRQ1*

Human gene	Yeast orthologs	Description	Cloning sites
<i>APE1</i>	<i>APN2</i>	AP endonuclease, DNA repair	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I
<i>BLM</i>	<i>SGS1</i>	RecQ family DNA helicase	<i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I
<i>FEN1</i>	<i>RAD27</i>	5' flap endonuclease	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I
<i>MCM10</i>	<i>MCM10</i>	Initiation of DNA replication	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I
<i>P300</i>	<i>GCN5</i>	Subunit of ADA and SAGA histone acetyltransferase	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I
<i>PARP1</i>	<i>RAD55</i>	Recombinational repair	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I
<i>POLb</i>	<i>POL4</i>	DNA polymerase IV, DNA repair	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I
<i>RAD51</i>	<i>RAD51</i>	Strand exchange protein	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I
<i>TFAM</i>	<i>NHP10</i>	Subunit of the chromatin-remodeling complex INO80	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I
<i>TOM20</i>	<i>TOM20</i>	Subunit of the translocase of outer membrane complex	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I
<i>XPA</i>	<i>RAD14</i>	Damaged DNA binding, Nucleotide excision repair	<i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I

Bernstein et al., 2010). 예를 들어, *Saccharomyces cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe*는 유일한 RecQ helicase로서 각각 Sgs1과 Rqh1을 가지고 있다고 알려져 있다.

그러나 생물정보 데이터베이스 분석에 의해서 새로운 RecQ helicase인 Hrq1이 곰팡이와 식물의 유전체에 존재한다고 예측되었는데, 이 유전자는 인간의 RECQL4와 가장 높은 유사성을 보였다(Barea et al., 2008). 그리고 *S. pombe*와 *S. cerevisiae*에서 유전학적 연구를 통해서 이 유전자가 세포 내에서 발현이 되며 기능을 하는 유전자임이 밝혀졌다(Grocock et al., 2012; Choi et al., 2013). *S. pombe hrq1Δ* 돌연변이는 유전체 불안정성, DNA 재조합 빈도, 그리고 돌연변이 발생 빈도가 증가하는 표현형을 보였으며, 상위(epistasis) 분석을 바탕으로 Hrq1은 NER 경로에 관여할 것으로 제안되었다. *S. cerevisiae hrq1Δ* 돌연변이도 DNA 재조합 빈도와 돌연변이 발생 빈도가 증가하였으며, 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) 또는 cisplatin에 의한 DNA 손상에 민감한 표현형을 보였다(Choi et al., 2013). 뿐만 아니라 수순 분리된 재조합 Hrq1 단백질은 다른 RecQ helicase 들처럼 3'-5' helicase 활성과 DNA strand-annealing 활성을 나타내었다(Kwon et al., 2012).

본 연구에서는 *S. cerevisiae* Hrq1의 기능에 대한 보다 구체적인 실마리를 얻기 위하여 Hrq1과 상호작용하는 유전자를 찾았다. 그 결과, NER에 관여하는 Rad14이 Hrq1과 yeast two-hybrid 상호작용을 보이는 것을 발견하였다. 뿐만 아니라 정제된 단백질을 이용한 pull-down assay를 통하여 단백질 사이의 직접적인 상호작용을 관찰하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 돌연변이 제조

Yeast two-hybrid 분석을 위하여 *S. cerevisiae* PJ69-4A (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) (James et al., 1996)를 사용하였다. 효모 배양에 사용한 완전배지(YPD)와 최소배지(synthetic complete, SC)는 Chris 등(1994)의 방법을 따랐다. 유전자 삭제 돌연변이 제조에는 one-step gene replacement

방법(Baudin et al., 1993)을 사용하였다. *rad4Δ* 돌연변이를 얻기 위해서 *RAD4* open reading frame (ORF)의 5' 또는 3' flanking region과 50 base-pair에 걸쳐 상동성을 갖는 primer를 사용하여 PCR 방법으로 선발 표지자(*URA3*)를 증폭하였다. PCR 산물을 agarose gel에서 정제한 후 PJ69-4A 균주에 형질전환하여 Ura⁺ colony를 얻었다. 얻어진 colony들 중에서 *RAD4* 유전자가 삭제된 것들을 colony PCR 방법으로 확인하였다.

Yeast two-hybrid 분석

*HRQ1*과 조사하려는 유전자의 ORF를 Table 1에 표시된 제한효소 자리를 이용하여 pGBD-c1과 pGAD-c1 plasmid (James et al., 1996)에 클로닝하였다. 양성 대조군으로는 pGAD-*RNR2*와 pGBD-*RNR4*를 사용하였다(Choi et al., 2014). *RNA2*와 *RNR4*는 효모의 ribonucleotide reductase를 암호화하는 유전자로서 복합체를 형성하여 효소활성에 필수적인 작은 소단위를 구성한다(Huang and Elledge, 1997; Wang et al., 1997). Two-hybrid 분석을 위해서 재조합 plasmid를 PJ69-4A 균주에 형질전환시켰다. PJ69-4A 균주는 GAL4 promoter에 의해 조절되는 *HIS3* reporter 유전자를 가지고 있기 때문에 bait와 prey 단백질이 상호작용하면 His⁺ 표현형이 나타나 histidine이 없는 배지에서 성장할 수 있게 된다. 따라서 two-hybrid 상호작용을 관찰하기 위해서 재조합 plasmid로 형질전환된 효모 균주 배양액을 histidine이 없는 SC 최소배지에 spotting한 다음 30°C에서 3-5일간 배양하면서 효모의 성장을 관찰하였다. DNA 손상이 two-hybrid 상호작용에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO, 10 ng/ml), cisplatin (20 μg/ml), 또는 methyl methanesulfonate (MMS, 0.005%)를 포함하는 SC 배지에 효모 배양액을 spotting하였다. 자외선의 영향을 관찰하기 위해서는 효모 배양액을 SC 배지에 먼저 spotting한 다음 자외선 (30 J/m²)을 쬐여주고 어두운 곳에서 배양하였다.

Hrq1과 Rad14 단백질 정제

FLAG-Hrq1 재조합 단백질을 생산하기 위해서 *HRQ1* ORF를 PCR 증폭하여 N-말단 FLAG-tag을 가진 pFastBacHTb plasmid (Invitrogen)의 *SacI-NotI* 자리에 클로닝하였다. 이 재조합

plasmid를 이용하여 제조사에서 제공한 방법대로 baculovirus를 만들고 Sf9 곤충세포에 감염시켜 단백질을 발현시켰다. FLAG-Hrq1의 정제는 anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich)를 사용하여 Kwon 등(2012)에 기술된 대로 정제하였다. Strep-Rad14를 얻기 위해서는 N-말단 14 아미노산이 결합된 *RAD14* ORF (Rodriguez *et al.*, 1998)를 PCR 증폭하여 N-말단 Strep-tag (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)을 가진 pET28a plasmid (Novagen)의 *EcoRI-XhoI* 자리에 클로닝하였다. 이 재조합 plasmid를 BL21DE3(pLysS)에 형질전환시켜 단백질을 발현시키고 Strep-tactin bead (Qiagen)를 사용하여 Rodriguez 등 (1998)에 기술된 대로 정제하였다.

결 과

Hrq1과 Rad14 사이의 yeast two-hybrid 상호작용

효모의 Hrq1과 아미노산 서열이 가장 비슷한 RecQ helicase는 인간 RECQL4이다(Barea *et al.*, 2008). RECQL4는 비교적 오랫동안 연구되어 왔으며 다양한 연구를 통하여 RECQL4와 상호작용하는 것으로 예상되는 여러 단백질들이 알려져 있다(Croteau *et al.*, 2012). 이러한 단백질들의 orthologue들이 효모에도 존재하는데 이를 Table 1에 정리하였다. 만약 Hrq1이 아미노산 서열뿐만 아니라 기능적으로도 인간 RECQL4의 orthologue 라면 Table 1에 열거된 효모 유전자들이 Hrq1과 상호작용할 가능성이 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 이들과 Hrq1 사이의 상호작용을 yeast two-hybrid 방법으로 조사하고자 하였다. 각 유전자들이 클로닝된 pGAD plasmid와 pGBD-*HRQ1*을 이용하여 yeast two-hybrid 실험을 수행하였으며 그 결과의 일부를 Fig. 1에 보였다. Table 1에 열거된 11개의 유전자는 모두 SC (+His) 배지에서 효모의 성장에 영향을 주지 않았다(자료 미제시, Fig. 1 참조). SC (-His) 배지에서는 음성 대조군(vector)으로 사용한 pGAD 벡터만으로도 SC (-His) 배지에서 어느 정도 성장을 보였는데, 이보다 더 나은 성장을 보이는 것은 *RAD14* 뿐이었다(Fig. 1A). 그러나 이 상호작용도 양성 대조군으로 사용한 *RNR2*

와 *RNR4* 사이의 상호작용보다는 약하였다. pGBD 벡터와 pGAD-*RAD14* 사이에는 two-hybrid 상호작용이 나타나지 않는 것으로 보아(Fig. 3), Fig. 1의 SC (-His) 배지에서 관찰되는 효모의 성장은 Hrq1과 Rad14 사이의 상호작용에 의한 것으로 판단된다. pGAD-*HRQ1*을 사용하였을 때에는 pGBD 벡터를 넣어 준 음성 대조군(vector)에서 background 성장이 보이지 않았다(Fig. 1B). 동시에 *RAD14*를 제외한 다른 유전자들에서도 SC (-His) 배지에서 효모의 성장을 전혀 관찰할 수 없었다. 그러나 *RAD14*의 경우에는 매우 약하지만 상호작용을 관찰할 수 있었다. 따라서 조사한 유전자들 중에 Rad14만이 Hrq1과 약한 yeast two-hybrid 상호작용을 하는 것으로 생각된다.

Hrq1과 Rad14 단백질의 직접적인 상호작용

Yeast two-hybrid assay보다는 좀 더 직접적인 방법으로 Hrq1과 Rad14의 상호작용을 관찰하기 위하여 pull-down assay 방법을 사용하고자 하였다. 이를 위하여 염색체 상의 *HRQ1*과 *RAD14* 유전자의 3'-말단 쪽에 각각 tandem affinity purification (TAP) tag와 hemagglutinin (HA) tag를 융합시킨 균주를 제조하고 pull-down 실험을 수행하였다. 그러나 IgG bead를 사용하여 Hrq1-TAP 융합단백질을 침전시켰을 때 Rad14-HA가 같이 침전되지 않았다(자료 미제시). 반대로 Rad14-HA를 침전시켰을 때도 Hrq1-TAP의 공동 침전을 관찰할 수 없었다(자료 미제시).

다음으로 정제된 단백질을 이용하여 pull-down assay를 수행해 보았다. 이를 위하여 재료 및 방법에서 설명한대로 FLAG-Hrq1과 Strep-Rad14를 발현시키고 각각 anti-FLAG bead와 Strep-tactin bead를 사용하여 부분 정제하였다(Fig. 2A). 정제한 두 단백질을 혼합하여 일정 시간 동안 정치한 후, Strep-tactin bead로 침전시키고 Western blotting으로 분석하였다. 그 결과, Strep-Rad14과 같이 혼합한 FLAG-Hrq1의 상당한 양이 Strep-tactin bead에 의해 침전되는 반면, Strep-Rad14이 없는 시료에서는 background 수준의 FLAG-Hrq1만이 침전되었다(Fig. 2B). 이것은 Hrq1이 Rad14과 물리적으로 직접적인 상호작용을 한다는 것을 뒷받침하는 결과이다. 그러나 높은 이온 농도(300 mM NaCl)에서는

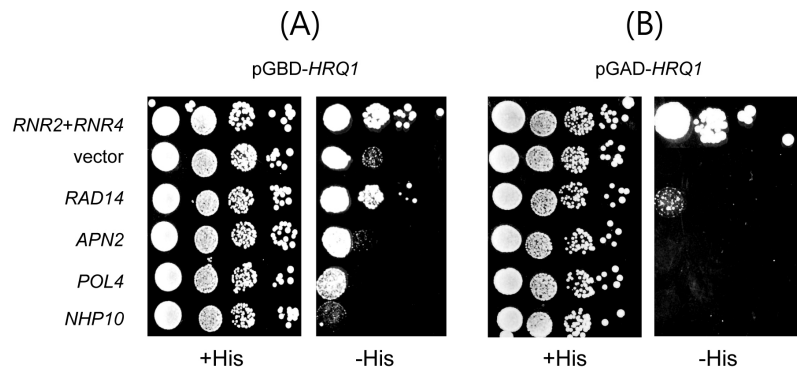


Fig. 1. Spotting test for yeast two-hybrid interactions between Hrq1 and the selected candidate genes. The candidate genes transformed into PJ69-4A strain are indicated at the left of the figure. PJ69-4A strain was transformed with pGBD-*HRQ1* and pGAD-X (A) or pGAD-*HRQ1* and pGBD-X (B), where X is one of the candidate genes. *RNR2+RNR4* and vector denote the positive and negative controls, respectively. After transformants were grown to saturation, serial 10-fold dilutions were spotted onto SC media plus histidine (+His) or minus histidine (-His), followed by incubation for 3-5 days at 30°C.

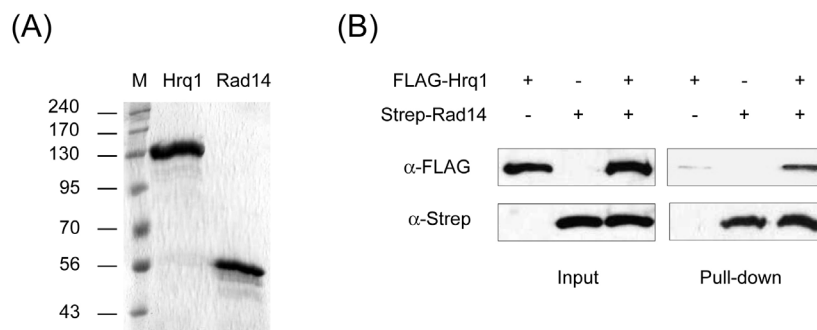


Fig. 2. Co-precipitation of Hrq1 and Rad14 proteins. (A) Coomassie staining of purified Hrq1 (3.5 μ g) and Rad14 (3.5 μ g) separated on SDS-PAGE (10%). M denotes molecular size markers. (B) Western blot showing precipitation of Strep-Rad14 and co-precipitation of FLAG-Hrq1.

FLAG-Hrq1이 침전되지 않는 것으로 보아(자료 미제시), 정제된 단백질 사이의 상호작용은 일시적이고 매우 약할 것으로 생각된다. 따라서 Hrq1과 Rad14 단백질 사이의 상호작용이 특이적이기 보다는 정제된 단백질 사이의 비특이적인 전기적 또는 소수성 상호작용일 가능성을 배제할 수는 없다.

4-NQO 특이적 DNA 손상에 의한 Hrq1-Rad14 상호작용의 촉진

*RAD14*는 NER에 관여하는 유전자이기 때문에 Hrq1과 Rad14 사이의 상호작용은 Hrq1이 NER 과정에서 어떤 역할을 할 가능성을 제기한다. 만약 그렇다면 DNA 손상에 의한 NER 활성화가 Hrq1과 Rad14 사이의 상호작용에 영향을 줄 수도 있다고 생각하였다. 이를 확인하기 위하여 ‘재료 및 방법’에 설명한 대로 4-NQO, cisplatin, MMS, 또는 자외선에 처리하여 효모의 DNA에 손상을 가하고 30°C에 배양하면서 two-hybrid 상호작용을 관찰하였다(Fig. 3). 4-NQO에 의한 DNA 손상은 아무것도 처리하지 않았을 때와 비교하여 양성 대조군(*RNR2*와 *RNR4*)의 상호작용을 약간 약화시켰다. 그러나 Hrq1과 Rad14 사이의 상호작용은 오히려 상대적으로 증가하는 것을 발견하였다. 이러한 현상은 여러 번의 반복 실험에서 일관되게 관찰되었으며, 그

중에 한 결과를 Fig. 3에 보였다. 그러나 DNA 손상에 의한 Hrq1-Rad14 상호작용의 촉진은 4-NQO를 처리했을 때만 특이적으로 관찰되었다. 즉, cisplatin, MMS, 그리고 자외선에 의한 DNA 손상은 Hrq1-Rad14 상호작용을 촉진시키지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어 Hrq1은 NER을 활성화시키는 모든 종류의 DNA 손상을 수선하는데 관여한다기 보다는 어떤 특정한 손상의 수선 과정에만 작용할 것으로 생각된다.

Rad4에 의존적인 Hrq1-Rad14 상호작용의 촉진

NER에서 Rad14의 작용은 Rad4에 의존적이다. Rad4는 NER 인자들 중에 가장 상위단계에서 작용하며 NER이 활성화되는데 필수적이다. GGR이나 TCR에 의해 DNA 손상이 인식되면 NER에 공통적으로 작용하는 인자들이 손상된 DNA 부위에 차례로 조립되는데, 이때 Rad4가 가장 먼저 결합하여 다른 인자들을 끌어들이므로써 수선기구 조립에 핵심적인 역할을 한다 (Prakash and Prakash, 2000; Riedl *et al.*, 2003; Lafrance-Vanasse *et al.*, 2013). 따라서 4-NQO에 의한 Hrq1-Rad14 상호작용 촉진이 NER 활성화 때문이라면, 이 과정은 Rad4에 의존적일 가능성이 있다. 이를 조사하기 위하여 *rad4* Δ 돌연변이를 제조하고 이

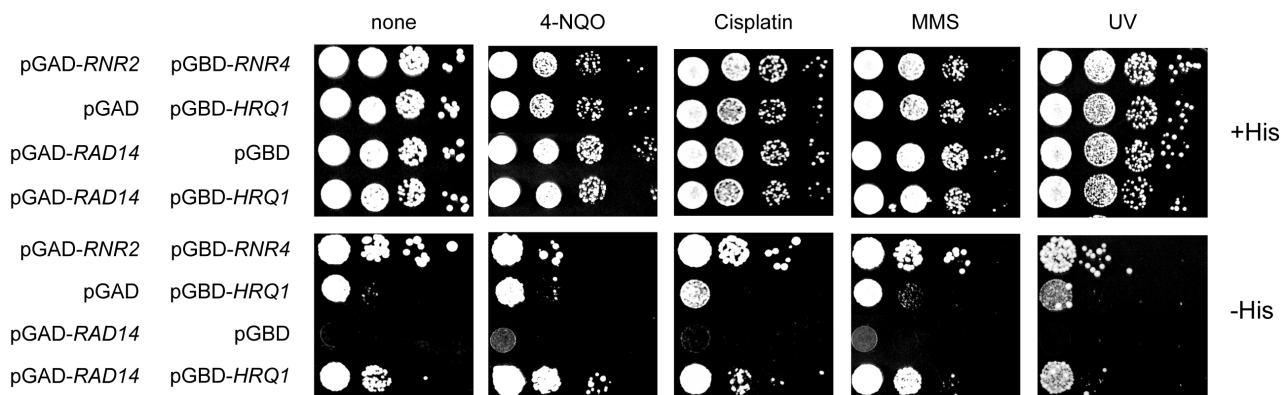


Fig. 3. Yeast two-hybrid interactions between Hrq1 and Rad14. The plasmids transformed into PJ69-4A strain are indicated at the left of the figure. After transformants were grown to saturation, serial 10-fold dilutions were spotted onto SC media plus histidine (+His) or minus histidine (-His), followed by incubation for 3-5 days at 30°C. To induce DNA damage, 4-NQO (10 ng/ml), cisplatin (20 μ g/ml), or MMS (0.005%) was added to the SC plates. To test the effect of UV irradiation, cells spotted on SC plates were irradiated with UV (30 J/m²).

균주에서 yeast two-hybrid 실험을 수행하였다(Fig. 4). 아무것도 처리하지 않았을 때(none) 야생형 균주에서 관찰되던 수준의 Hrq1-Rad14 상호작용이 *rad4Δ* 돌연변이에서도 관찰되었다. 그러나 4-NQO를 처리했을 때 야생형에서 관찰되던 상호작용의 촉진은 더 이상 관찰되지 않았다(Figs. 3 and 4). 따라서 기본적인 수준의 Hrq1-Rad14 상호작용에는 Rad4가 필요하지 않으나 DNA 손상에 의해 상호작용이 촉진되기 위해서는 Rad4가 필수적이라고 생각된다.

고찰

본 연구에서는 Hrq1과 상호작용할 가능성이 있는 유전자들을 대상으로 yeast two-hybrid assay를 수행하여 Rad14이 Hrq1과 상호작용이 있는 것을 발견하였다. 또한 정제된 단백질을 이용한 pull-down assay로 Hrq1과 Rad14 사이의 직접적인 상호작용이 확인되었다. Hrq1과 Rad14 사이의 two-hybrid 상호작용은 4-NQO 처리에 의해 증가하였으며, 이러한 상호작용의 증가는 Rad4에 의존적인 것으로 보아 NER의 활성화와 관련이 있을 것으로 생각된다. 최근 본 연구진은 상위 분석을 통해서 *RAD4* 유전자가 *HRQ1*의 상위에서 작용한다는 것을 보고하였다(Choi *et al.*, 2014). 이 연구에서 여러 가지 DNA 수선 돌연변이들과 *hrq1Δ* 이중돌연변이는 단일 돌연변이들보다 4-NQO에 대한 민감성이 증가한 반면, *rad4Δ* 돌연변이에 대해서는 *hrq1Δ* 돌연변이가 아무런 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 Hrq1-Rad14 two-hybrid 상호작용의 증가가 Rad4에 의해 영향을 받는다는 Fig. 4의 결과와 일치하는 것이다. 뿐만 아니라 Hrq1과 Rad4 사이에도 two-hybrid 상호작용이 관찰되었다(Choi *et al.*, 2014). 그러나 Hrq1과 Rad14 사이의 two-hybrid 상호작용은 *rad4Δ* 돌연변이 background에서도 관찰되기 때문에(Fig. 4), 두 단백질 사이의 상호작용이 Rad4를 매개로 하는 간접적인 상호작용 같지는 않다. 더구나 pull-down assay는 정제된 Hrq1과 Rad14 단백질을 사이의 직접적인 상호작용을 보여주고 있다(Fig. 2). 따라서 Hrq1은 Rad14 뿐만 아니라 Rad4와도 직접적인 상호작용

을 할 것으로 예상된다.

Hrq1과 Rad14 사이의 상호작용이 NER의 활성화 과정과 관련이 있다면 분명히 손상된 DNA 부위에서 상호작용이 일어나야 한다. 그런데 yeast two-hybrid assay는 GAL promoter 상에서 BD-융합단백질과 AD-융합단백질 사이에서 일어나는 상호작용을 관찰하는 것이다. 따라서 4-NQO 처리에 의한 Hrq1-Rad14 two-hybrid 상호작용의 증가는 Rad14가 손상된 DNA에 결합하는 것과는 무관할 것이다. 아마도 DNA 손상에 의해 NER 인자들이 활성화되면 DNA에 결합하지 않고도 어느 정도 상호작용이 증가한다고 추측된다. 또 다른 가능성으로는 Fig. 3의 실험은 효모가 비교적 높은 농도의 4-NQO에 지속적으로 노출되어 끊임없이 DNA 손상을 받는 조건이므로 우연히 GAL promoter 부위에 DNA 손상이 가해지면 NER 인자들이 조립되면서 two-hybrid 상호작용이 증가하는 것일 수도 있다.

인간세포에서 RECQL4는 XPA (Rad14의 인간 orthologue)와의 상호작용을 통해서 자외선에 의해 손상된 DNA 수선에 관여하는 것으로 보고되었다(Fan and Luo, 2008). *S. pombe* Hrq1도 Rhp14 (Rad14의 *S. pombe* orthologue)과 물리적인 상호작용을 하는 것이 공동면역침전(co-immunoprecipitation) 방법으로 확인되었다(Grocock *et al.*, 2012). 따라서 본 연구에서 관찰된 Hrq1과 Rad14 사이의 two-hybrid 상호작용은 위의 연구들과 일치하는 결과이다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 본 실험에서는 Hrq1-TAP과 Rad14-HA의 공동 침전을 관찰할 수 없었다. 이것은 Hrq1과 Rad14의 상호작용이 매우 약하거나 일시적이기 때문일 가능성이 있다. 또 다른 가능성으로는 면역침전을 쉽게 하기 위하여 붙인 tag이 단백질 상호작용에 입체장애를 일으킬 가능성이 있다. Yeast two-hybrid를 위한 plasmid는 단백질의 N-말단 부위에 AD 또는 BD를 융합시키도록 디자인되어있지만, TAP과 HA tag은 염색체 상의 유전자의 3'-말단에 삽입하여 단백질의 C-말단과 융합되도록 디자인되어있다. 만약 Hrq1과 Rad14의 C-말단이 단백질 상호작용에 중요하다면 본 연구에서 사용한 융합단백질로는 상호작용을 관찰할 수 없을 것이다. 따라서 N-말단에 tag이 융합된 단백질을 제조하여 실험할 필요성이 있다.

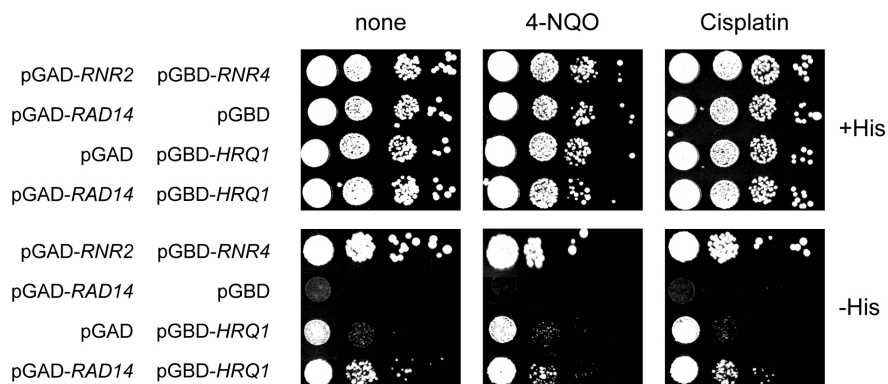


Fig. 4. Effect of *rad4Δ* on yeast two-hybrid interactions between Hrq1 and Rad14. The plasmids transformed into the *rad4Δ* strain are indicated at the left of the figure. After transformants were grown to saturation, serial 10-fold dilutions were spotted onto SC media plus histidine (+His) or minus histidine (-His), followed by incubation for 3–5 days at 30°C. To induce DNA damage, 4-NQO (10 ng/ml) or cisplatin (20 μg/ml) was added to the SC plates.

NER 과정에는 많은 인자가 관여하며 NER 인자 사이의 복잡한 상호작용에 의해서 손상된 DNA에 NER 인자들이 순차적으로 조립하게 된다(Prakash and Prakash, 2000). 따라서 Hrq1의 구체적인 기능을 연구하기 위해서는 보다 많은 NER 인자들과의 상호작용을 조사해야 할 것이다. 뿐만 아니라 Hrq1 helicase 활성의 특성을 보다 면밀히 연구하는 것도 이 새로운 helicase의 기능을 밝히는데 중요할 것으로 생각된다.

적 요

Hrq1은 곰팡이 유전체에서 생물정보분석에 의해 발견된 새로운 RecQ helicase이다. 이 단백질은 인간의 RECQL4와 가장 상동성이 높으며 최근의 유전학적 생화학적 연구를 통해서 유전체 안정성을 유지하는데 어떤 역할을 할 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 RECQL4와 상호작용하는 것으로 알려진 인간 유전자들과 상동성이 있는 효모 유전자들이 Hrq1과 상호작용하는지를 yeast two-hybrid assay를 이용하여 조사하였다. 총 11개의 유전자를 조사한 결과, nucleotide excision repair (NER) 인자 중의 하나인 Rad14이 Hrq1과 상호작용하는 것을 발견하였다. 또한 정제된 단백질을 이용한 pull-down assay로 Hrq1과 Rad14 사이의 직접적인 상호작용을 확인하였다. Hrq1과 Rad14 사이의 yeast two-hybrid 상호작용은 4-nitroquinoline-1-oxide에 의한 DNA 손상으로 더욱 증가하였으며, 이러한 상호작용의 증가는 또 다른 NER 인자인 Rad4에 의존적이었다. 이러한 결과들은 Hrq1이 Rad14과의 상호작용을 통하여 NER 과정에 어떤 역할을 할 가능성을 제시하고 있다.

감사의 말

이 논문은 한국연구재단(2012R1A1A2009053)의 연구비로 수행되었습니다.

References

- Ashton, T.M. and Hickson, I.D. 2010. Yeast as a model system to study RecQ helicase function. *DNA Repair* **9**, 303-314.
- Barea, F., Tessaro, S., and Bonatto, D. 2008. *In silico* analyses of a new group of fungal and plant RecQ4-homologous proteins. *Comput. Biol. Chem.* **32**, 349-358.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329-3330.
- Bernstein, K.A., Gangloff, S., and Rothstein, R. 2010. The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 393-417.
- Bohr, V.A. 2008. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 609-620.
- Choi, D.H., Lee, R., Kwon, S.H., and Bae, S.H. 2013. Hrq1 functions independently of Sgs1 to preserve genome integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* **51**, 105-112.
- Choi, D.H., Min, M.H., Kim, M.J., Lee, R., Kwon, S.H., and Bae, S.H. 2014. Hrq1 facilitates nucleotide excision repair of DNA damage induced by 4-nitroquinoline-1-oxide and cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* **52**, 292-298.
- Chris, K., Michaelis, S., and Mitchell, A. 1994. Methods in yeast genetics. pp. 207-217. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Chu, W.K. and Hickson, I.D. 2009. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 644-654.
- Compe, E. and Egly, J.M. 2012. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 343-354.
- Croteau, D.L., Singh, D.K., Ferrarelli, L.H., Lu, H., and Bohr, V.A. 2012. RECQL4 in genomic instability and aging. *Trends Genet.* **28**, 624-631.
- Fan, W. and Luo, J. 2008. RecQ4 facilitates UV light-induced DNA damage repair through interaction with nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A (XPA). *J. Biol. Chem.* **283**, 29037-29044.
- Grocock, L.M., Prudden, J., Perry, J.J., and Boddy, M.N. 2012. The RecQ4 orthologue Hrq1 is critical for DNA interstrand cross-link repair and genome stability in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* **32**, 276-287.
- Guzder, S.N., Sommers, C.H., Prakash, L., and Prakash, S. 2006. Complex formation with damage recognition protein Rad14 is essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 nuclease to perform its function in nucleotide excision repair *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1135-1141.
- Huang, M. and Elledge, S.J. 1997. Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6105-6113.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Kwon, S.H., Choi, D.H., Lee, R., and Bae, S.H. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* Hrq1 requires a long 3'-tailed DNA substrate for helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 623-628.
- Lafrance-Vanasse, J., Arseneault, G., Cappadocia, L., Legault, P., and Omichinski, J.G. 2013. Structural and functional evidence that Rad4 competes with Rad2 for binding to the Tfb1 subunit of TFIIH in NER. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2736-2745.
- Mardiros, A., Benoun, J.M., Haughton, R., Baxter, K., Kelson, E.P., and Fischhaber, P.L. 2011. Rad10-YFP focus induction in response to UV depends on RAD14 in yeast. *Acta Histochem.* **113**, 409-415.
- Prakash, S. and Prakash, L. 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* **451**, 13-24.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.M. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* **22**, 5293-5303.
- Rodriguez, K., Talamantez, J., Huang, W., Reed, S.H., Wang, Z., Chen, L., Feaver, W.J., Friedberg, E.C., and Tomkinson, A.E. 1998. Affinity purification and partial characterization of a yeast multiprotein complex for nucleotide excision repair using histidine-tagged Rad14 protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 34180-34189.
- Tsodikov, O.V., Ivanov, D., Orelli, B., Staresinic, L., Shoshani, I., Oberman, R., Scharer, O.D., Wagner, G., and Ellenberger, T. 2007. Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *EMBO J.* **26**, 4768-4776.
- Wang P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L., and Huffaker, T.C. 1997. Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6114-6121.