

Yeast Two-hybrid System을 이용한 cTPx II 결합단백질 탐색 및 분석

오영미, 차미경, 김일한*
배재대학교 자연과학대학 생명공학과

Screening and Analysis for cTPx II-Interacting Protein Using Yeast Two-hybrid System

Young-Mee Oh, and Mee-Kyung Cha, Il-Han Kim
Department of Life Science and Technology, Paichai University

효모에는 5가지 종류의 thiol peroxidase 동위효소들인 cytoplasmic TPx I, cTPx II, cTPx III, mitochondrial TPx (mTPx), 및 nuclear TPx (nTPx)가 존재하고 있다. 특히, cTPx II는 다른 효모 TPx들과 비교해 볼 때 매우 낮은 peroxidase 활성을 보이거나, cTPx II를 제거한 cTPx II mutant 균주는 심하게 성장이 저해되는 특징을 보인다. 본 연구에서는 효모에서의 cTPx II의 생리학적 기능을 밝히는 연구의 첫 과정으로 cTPx II와 상호 작용하는 단백질을 탐색하였다. *Sacchromyces cerevisiae* genomic DNA library에서 yeast two-hybrid system을 이용하여 cTPx II와 상호 결합하는 단백질을 탐색하여 그 단백질들의 기능을 연구하여, 궁극적으로 cTPx II의 생리기능을 밝히는데 이 연구의 목적을 두었다.

There are five isoforms of thiol peroxidase in yeast. Each isoform was named after its subcellular localization such as cytoplasmic TPx I, cTPx II, cTPx III, mitochondrial TPx (mTPx),

* 책임저자

and nuclear TPx (nTPx). Recently, we reported that unlike other TPx null mutants, cTPx II null mutant showed a slow-growth phenotype. This observation suggests that cTPx II might be involved in yeast cell growth. In this study, for a first step toward to investigate the physiological function of cTPx II in yeast, we have identified a novel interaction between cTPx II and various proteins by using the yeast two-hybrid system.

I. 서 론

모든 생명체는, 대사과정 중에 생성되는 활성산소종 (Reactive Oxygen Species; ROS)에 의해 핵산, 단백질, 생체막 지질들이 산화되는 위험을 제거하기 위해, 일련의 항산화 효소들을 가지고 있다. 이 항산화 효소들로 SOD (Superoxide Dismutase), Catalase, 및 각종 Peroxidase들이 잘 알려져 있다 (1). 약 10여년전에 지금까지 알려진 항산화효소와 전혀 다른 항산화 효소가 효모에 존재함이 밝혀진 이래, 본 연구실을 포함한 국내외의 여러 연구진들에 의해 꾸준한 연구가 진행되어 그 효소학적 특성이 밝혀졌다. 이 효소는 Thioredoxin과 같은 외부의 환원력을 이용하여 Peroxide를 환원시키는 Peroxidase 효소 활성을 지니고 있고, Peroxidase 활성의 일차적 촉매 작용기가 시스테인의 Thiol기입이 밝혀졌다 (2-7). 따라서 기존의 Selenocysteine Peroxidase와 구별하기 위해서 본 연구실에서는 본 효소를 "Thiol Peroxidase"이라 명명하고 있다. 이 효소는 효모 뿐 아니라 원시 박테리아에서 포유류에 걸쳐 전 생명체에 걸쳐 널리 분포되어 있고, 더욱이 여러 종류의 동위효소 (Isoenzyme)로 존재해서, 각 동위효소들의 생리적 역할에 대해 많은 관심이 집중되어 있다 (8-20). 최근의 결과에 의하면 사람에는 여섯 개의 Isoenzyme이 존재하는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 각 Isoenzyme의 생리 기능에 대해서는 종합적으로 연구되어져 있지 않은 상태이었다.

본 연구실에서 Thiol Peroxidase의 Isoenzyme의 생리기능 연구의 일환으로 고등세포의 Moldel System으로 효모를 대상으로 Thiol Peroxidase에 대한 연구를 하였다. 그 결과 본 연구실에서 지금까지 알려져 있지 않은 3종류의 Isoenzyme이 더 존재한 다는 것을 증명하여서, 효모에는 5 종류의 Isoenzyme이 존재함을 밝혀 보고 한 바 있다 (21). 이 5 종류의 효모 Thiol Peroxidase Isoenzyme을 대상으로 종합적으로 효소학, 분자생물학 및 세포생물학 적인 연구를

수행한 바 이 Isoenzyme들의 생리적 기능을 어느 정도 예측할 수 있었다. 3 종류의 Isoenzyme은 원형질 (Cytoplasm)에 존재하고 2 종류는 미토콘드리아와 핵에 각각 존재하여 그것들의 명명을 Cytoplasmic Thiol Peroxidase I (cTPx I), cTPx II, cTPx III, Mitochondrial TPx (mTPx) 및 Nuclear TPx (nTPx)로 하였다. cTPx I 과 cTPx III는 다른 Isoenzyme 보다 적어도 10배 이상 과량 존재하고 있고, cTPx III는 cTPx I과 달리 Alkyl Peroxide를 선택적으로 제거하는 Alkyl Hydroperoxide Peroxidase의 생리적 역할을 하고 있음을 효소학적 연구 및 각각의 Null Mutant들을 이용하여 밝혔다.

cTPx II의 단백질의 일차구조에 있어서 cTPx I과 거의 같지만, Peroxide에 대한 활성은 cTPx I에 비해 10% 정도에 지나지 않으며, 세포내의 발현 정도는 5% 정도에 지나지 않는다. cTPx I의 Null mutant는 Oxidative Stress에 매우 민감해 Growth가 Wild Type에 비해 현저히 감소되지만, cTPx II의 Null Mutant는 Oxidative Stress에 대한 민감도는 Wild Type에 비해 거의 차이가 없지만 성장 속도에 있어서는 cTPx I Mutant에 비해 현저히 감소되는 현상을 보인다. 5 종류의 Mutant들의 Cell Cycle을 조사 해본 결과 cTPx II Mutant만이 G1 Phase의 Population이 현저히 증가됨을 Flow Cytometry 분석을 통해 알 수 있었다. 따라서 분명히 cTPx II는 다른 Isoenzyme과 달리 Peroxidase로서의 생리기능 보다는, 자세한 기작은 모르지만 효모의 G1 Phase Cell Cycle에 관여하여 효모의 성장을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

세포 내에서 일어나는 거의 모든 생명현상들은 수많은 단백질의 상호작용을 통해 수행되고 조절되어진다. 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. 이들의 조절에 관련되는 단백질간의 상호작용을 분석하여 각각의 기능을 밝히고 상대적인 관계를 규명하는 방법으로 Yeast Two-Hybrid system이 널리 이용되고 있다. 최근, 다른 TPx null mutants와 달리 cTPxII null mutant는 늦은 성장 표현형을 가지고 있어 결과적으로 G1-phase cell이 축적됨을 알았다 따라서 효모 TPx Isoenzyme 중 생체신호 전달 매개체로서의 효모의 성장에 작용할 가능성이 가장 높은 cTPx II와 상호 작용하는 새로운 단백질을 찾아내어 알려진 단백질들과의 관계를 밝혀 hTPx II의 세포 내에서의 생화학적 현상과 기전을 연구하는데 궁극적인 목적을 두고, 우선 본 연구에서는 cTPx II와 결합하는 단백질을 탐색하여 그 단백질들의 기능을 분석하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. Strain

yeast two-hybrid system을 이용하기 위해 사용한 균주는 EGY048이며, *Sacchomyce cerevisiae* genomic DNA library로부터 상호 반응하는 clone을 선별하기 위해 사용하였다. 이 strain은 *lexA* operator의 조절아래에서 *LEU2* gene의 transcription이 일어나고 *LacZ* report gene을 갖는 것으로, yeast로부터 준비된 plasmid는 Amp^r를 갖고 있는 XL1-blue라는 *E.coli* 균주로 transformation함으로써 증폭했다.

2. Plasmid

p8op-lacZ는 *URA3* selection marker, *lexA* operator, 그리고 *lacZ* reporter gene으로 이루어진 plasmid이다. Bait plasmid로는 *HIS3* selection marker와 DNA binding domain을 갖고 있는 pLexA를 사용하였고, B42 activation domain을 갖고 있는 pJG4-5는 *Saccharomyce cerevisiae* genomic DNA library에 들어있는 plasmid로써 full gene cloning 시에도 사용하였다.

3. Culture

본 실험에서 사용한 배지는 synthetic dropout (SD) minimal media로 yeast의 형질 전환체의 선별을 위해서 사용하였다. 균주들을 각각의 plasmid를 선별할 수 있는 10×dropout solution과 glucose 배지에서 30°C 온도 유지 하에서 3일간 배양했다. Bait로 이용한 cTPxII와 library genomic DNA의 상호관계를 알아보기 위한 library screening 시에는 균주를 rich media인 YPG를 이용하여 induction한 후에 uracil, histidine, tryptophan, leucine이 없는 10×dropout solution과 galactose를 첨가한 배지에서 배양하였다. 이들을 각각 uracil, histidine, tryptophan이 빠진 10×dropout solution, glucose에서 선별하였고, 각각 glucose, galactose가 첨가된 배지에서 auxotroph test를 한 후, cTPxII와 상호관계가 있는 plasmid만을 얻기 위하여 tryptophan이 빠진 10×dropout solution, glucose 배지에서 배양하였다. *E.coli* 균주들은 LB ampicillin 배지에서 배양하였다.

4. Construction of plasmid

cTPxII 단백질과 상호 작용을 하는 단백질을 찾기 위해 pLexA vector에 cTPx II 유전자를 subclone하고 이를 bait으로 하여 Yeast genomic DNA library를 사용하여 Two-hybrid를 하였다. cTPx II 구조 유전자를 Subcloning하기 위해 사용한 primer는 아래와 같다.

Forward primer: 5'gaattcatggtagcagaagttcaaaaacaag

Reversed primer: 5'ggatccttaattattggcattttgaaatac

5. Bait transformation

Yeast strain EGY048에 pLexA/cTPxII fusion plasmid를 LiAc method를 사용하여 transformation 하였다.

6. TransAct assay

Yeast two-hybrid 수행시, bait (pLexA vector에 알고자 하는 protein의 construct)가 단독으로 숙주 세포 내의 LacZ reporter gene을 발현시킬 수 있는지를 우선 확인하여야 한다. 만일 bait 단독으로 LacZ gene과 같은 reporter gene을 발현하여 β -galactosidase를 생성할 때는 두 단백질 간의 상호작용이나 결합하는 단백질의 screening이 적합하지 않다.

이러한 bait 단독의 LacZ 발현은 pLexA vector에 삽입한 coding sequence가 DNA binding domain에 fusion되어 transcription을 activation 일어나는 결과로, transcription activation 기능이 있는지를 확인하는 과정으로 실험 전, bait plasmid의 construction을 확인하기 위해 sequencing을 통해 frame을 확인하였다.

7. Library screening

Library는 *Sacchomyce cerevisiae* genomic DNA가 pJG4-5에 random하게 cloning되어 있는 것으로 DNA binding domain과 결합하여 B42 fusion protein을 발현할 수 있는 activation domain이다. LexA/cTPxII hybrid protein이 포함되어 있는 EGY048에 LiAc method를 사용하여 library screening을 하였다. 2~3일 동안 incubation된 clony은 harvest하고 YPG 5ml에 50 μ l와 5 μ l를 접종하여 30 $^{\circ}$ C에 6hr동안 induction 한 후 UHWL-/Gal media에 500 μ l씩 spread함으로써 발현을 유도하며 2~3일 동안 clony를 incubation한다.

8. Screening for cTPx II binding protein

2000개 이상의 UHWL-/Gal media에서 유도된 colony은 X-Gal를 첨가한 UHW-/Glc,Gal media를 사용하여 β -galactosidase activity가 있는 colony만을 발색의 유무를 통해 얻는다. 그 선별된 colony들은 Leu reporter gene이 있는 것을 이용하여 Leucine이 결여된 media(UHWL-/Glc,Gal)를 통해 streaking하여 Gal에서만 자란 colony를 선별할 수 있다.

9. Plasmid isolation from Yeast

cTPxII와 binding하는 단백질을 W-/Glc media에서 3번 계대 배양하고 STES lysis solution과 0.5mm bead를 사용하여 pJG4-5를 갖는 plasmid를 isolation 하였다.

10. E.coli competent cell preparation

XL1-Blue를 CaCl₂가 첨가한 RF1, RF2를 사용하여 transformation이 용이한 cell를 만들었다.

11. Isolation of plasmid from library genomic DNA

yeast로부터의 plasmid를 competent cell에 transformation 하여 library DNA를 찾았다. transformation에서 얻은 colony들은 SDS alkaline mini prep을 사용하여 library에서의 pJG4-5의 restriction site을 확인함으로써 library 유래의 plasmid임을 확인하였다.

12. Confirm test

각각 E.coli에서 분리해 확인된 plasmid를 cTPxII가 들어있는 EGY048에 다시 transformation 하여 β -galactosidase activity 와 Leu reporter gene의 발현을 재확인하였다.

13. Sequencing and identification

분리된 library plasmid를 Bioneer sequencing premix kit와 pJG4-5 primer를 사용하여 PCR를 하였다. 6% acrylamide gel에 runing시킨 후, Bioneer Silverstar staining system kit을 사용하여 sequencing을 확인하고 NCBI 데이터베이스를 사용하여 homology search를 하였다.

14. β -Galactosidase assay

ONPG를 사용하여, β -Galactosidase의 발현 정도를 수치로 나타내었다. 우선, minimal media

에 16~18hr 동안 배양된 cell를 SD/Gal 배지에 OD₆₀₀=0.2로 접종하여 OD₆₀₀=5까지 키운다. cell을 harvest하고 0.5mm glass bead와 Z-buffer를 사용해 protein을 얻는다. bradford assay를 통해 단백질량을 확인한 후, 정량의 단백질에 Z-buffer/ β -mercaptoethanol를 첨가하고 30°C water-bath에 ONPG/Z-buffer를 첨가하여 발색정도를 확인하였다.

III. 연구 결과 및 분석

1. cTPx II와 결합하는 단백질 분석

Yeast genomic DNA library를 이용하여 cTPxII와 결합하는 단백질을 찾기 위해 screenig을 하였다. UHWL-/Gal 배지에서의 library screening을 통해서 얻은 colony를 선별하여 X-Gal에 포함되어 있는 UHW-/Glc, UHW-/Gal media에서의 colony를 선별한 뒤, UHWL-/Glc, UHWL-/Gal media에서의 auxotroph test로 재선별 하였다. 이렇게 선별된 colony들을 confirm test로 다시 한번 확인한 후, W-/Glc media에서 3번 계대 배양 한 후에 yeast에서 library genomic DNA를 분리하였다. 이 plasmid를 E.coli XL1-Blue에 transformation하여 증폭한 후, restriction enzyme을 사용하여 insert size를 각각 확인하였다. 또한 cTPxII와 상호 작용하는 가를 다시하기위해 confirm test를 다시 수행하였다. UH-/Glc에서 자란 EGY048-cTPxII LexA를 competent cell로 하여 transformation 하였다. 5개의 colony를 UHW-/Glc에 키우고, 그 각각을 X-Gal을 포함한 Glucose와 Galactose media에 키워 그 상호 관계를 재확인하였고, 각각의 colony를 sequencing 하여 Data base를 통하여 cTPx II와 결합하는 단백질 기능을 분석하였다. 그 결과를 아래에 나열하였다.

#A1: Transcription co-repressor.

#AFT2: Activator of Iron (Fe) Transcription.

#ARG82: Inositol/phosphatidylinositol kinase.

#ARK1: Protein serine/threonine kinase.

#BIP1: Baculoviral IAP repeat-containing protein.

#CAF130: Regulation of transcription from Pol II promoter.

#CPR7: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.

- #CSM3: Chromosome segregation in meiosis.
- #FAR1: Cyclin-dependent protein kinase inhibitor.
- #FOB1: DNA replication fork blocking protein.
- #GCR: Transcriptional activator.
- #GEA2: ARF guanyl-nucleotide exchange factor.
- #IES2: unknown.
- #LHS1: Chaperone, Hsp70 family.
- #MFT1: Protein-mitochondrial targeting
- #NFI1: Interacts with C-terminus of CDC12. Chromatin protein.
- #OSH3: Steroid biosynthesis. Oxysterol Binding Protein.
- #PAF1: Transcription. RNA polymerase II-associated, nuclear protein.
- #PEX18: Protein binding. Peroxin.
- #POL1: alpha DNA polymerase.
- #POL2: epsilon DNA polymerase.
- #PRE10: Proteasome endopeptidase.
- #REB1: Pol I transcription termination factor.
- #RPT2: Adenosinetriphosphatase proteasome endopeptidase
- #SGS1: ATP dependent DNA helicase.
- #SIR4: negative regulation of recombination within rDNA repeats, silencing regulator at HML, HMR, and telomeres.
- #SPF1: P-type ATPase.
- #SSN2: general RNA polymerase II transcription factor
- #TAF65: TFIID subunit.
- #YUR1: mannosyltransferase.
- #YCL01W: TyB Gag-Pol protein

2. cTPx II와 결합 정도 비교

각각의 fusion protein들의 yeast에서의 발현을 비교하기 위해서 우선 minimal media에서 16-18시간 동안 배양된 yeast cell을 SD/Gal media 10ml에 OD600=0.2로 접종한 후, OD600값이

5정도까지 배양하였다. 회수한 cell을 0.5mm glass bead를 사용하여 lysis하여 얻은 protein을 ONPG를 사용하여 β -Gal activity를 측정하여 cTPx II와 결합 정도를 비교하였다 (그림 1).

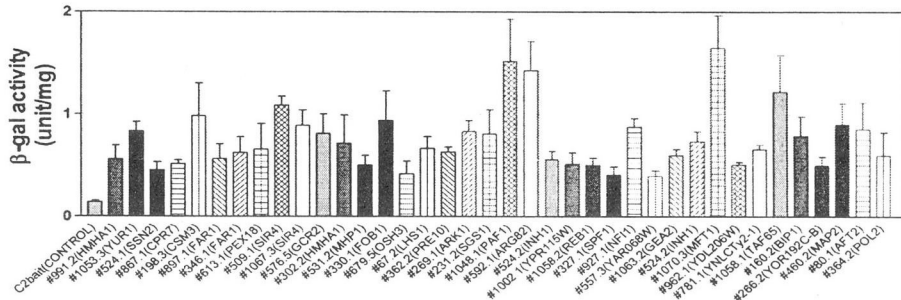


그림 1. Interaction between cTPx II and various cTPx II-binding proteins. cTPx II와 cTPx II 결합 단백질들의 결합정도를 측정하기위해 균주를 mid-log phase까지 도달할 때까지 배양한 후 효모 내에 발현된 β -galactosidase activity를 측정하였다. 자세한 실험 방법은 “실험 방법 및 재료” 참조.

이상의 결과를 분석하여 보면, 효모 cTPx II와 결합하는 단백질은 Transcription factor, Protein kinase, Polymerase regulatory subunit, Protease, 및 Chaperone등으로써 전체적으로 살펴보면 효모의 성장에 관련된 생체신호 전달 Network과 관련 있는 단백질들을 알 수 있었다. 따라서 이 단백질-단백질의 결합들에 대한 좀더 자세한 연구를 수행한다면 cTPX II 효모 성장에 관련된 기능을 밝히게 되리라 생각한다.

IV. 참고 문헌

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Production against radical damage: systems with problems. Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed, Clarendon press, Oxford.
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G. and Stadtman, E. R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4704-4711
- Kim, I. H., Kim, K. and Rhee, S. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6018-6022
- Chae, H. J., Kim, I. H., Kim, K. and Rhee, S. G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16815-16821

5. Lim, Y. S., Cha, M. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K. and Kim, I. H. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 273-280
6. Kwon, S. J., Park, J. W., Choi, W. K., Kim, I. H. and Kim, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 8-15
7. Chae, H. J., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27670-27678
8. Chae, H. J., and Rhee, S. G. (1994) *Biofactor*, 4, 177-180
9. Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K. and Kim, I. H. (1994) *Gene*. 140, 279-284
10. Lim, Y. S., Cha, M. K., Yun, C. H., Kim, H. K., Kim, K. and Kim, I. H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 199-206
11. Cha, M. K. and Kim, I. H. (1996) *J. Biochem. Mol. Biol.* 29, 236-240
12. Cha, M. K. and Kim, I. H. (1998) *J. Biochem. Mol. Biol.* 31, 409-412
13. Cha, M. K. and Kim, I. H. (1999) *J. Biochem. Mol. Biol.* 32, 506-310
14. Cha, M. K. and Kim, I. H. (1999) *J. Biochem. Mol. Biol.* 32, 168-172
15. Cha, M. K. and Kim, I. H. (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33, 234-241
16. Cha, M. K., Kim, H. K. and Kim, I. H. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 5610-5614.
17. Jeong, J. S., Kwon, S. J., Kang, S. W., Rhee, S. G. and Kim, K. (1999) *Biochemistry* 38, 776-783
18. Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J. and Toledano, M. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4537-4544
19. Cha, M. K., Yun, C., and Kim, I. H. (2000) *Biochemistry* 59, 6944-6950
20. Jeong, W., Cha, M. K., and Kim, I. H. (2000). *J. Biol. Chem.* 275, 2924-2930
21. Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W. and Kim, I. H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5723-5732