

이스트 two-hybrid 시스템을 이용한 hnRNP E1 cDNA의 클로닝과 hnRNP E1-hnRNP K 상호결합에 대한 연구

최미영^{1*}

Cloning of hnRNP E1 cDNA via yeast two-hybrid system and a study on protein-protein interaction between hnRNP E1 and hnRNP K

Mieyoung Choi^{1*}

요 약 hnRNP K 단백질은 hnRNP 복합체를 구성하는 핵단백질들 중의 하나이며 시토신이 많은 RNA/DNA sequence에 잘 결합한다. 이 단백질은 핵 내에서만 머무르지 않고 핵과 세포질을 왕복하는 특성을 지니고 있다. hnRNP K의 기능을 조사하기 위하여 우선 hnRNP K와 상호 결합하는 세포내 단백질을 찾아내고자 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 이스트 two-hybrid 시스템을 사용하여 HeLa cDNA library를 탐색하였다. 그 결과 얻은 클론들 중에는 사람의 hnRNP E1 (poly(rC) binding protein 1) cDNA (GenBank accession number XM_031585) 클론이 포함되어 있었다. 본 논문에서는 이스트 two-hybrid 시스템과 *in vitro*에서의 생화학적 실험을 통하여 hnRNP E1은 hnRNP K와 특이적으로 상호 결합한다는 것을 밝혔다.

Abstract The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a component of hnRNP complexes. This protein binds strongly to cytidine-rich RNA/DNA sequences. It is a nucleocytoplasmic shuttling protein. To investigate the functions of hnRNP K, I searched for hnRNP K-interacting proteins in HeLa cDNA library using a yeast two-hybrid screening system. One of the cDNA clones is identical to human hnRNP E1 (poly(rC) binding protein 1) cDNA (GenBank accession number XM_031585). In this study, hnRNP K is shown to specifically interact with hnRNP E1 in yeast two-hybrid system and *in vitro* biochemical assay.

Key Words : hnRNP K, KH domain, hnRNP E1, yeast two-hybrid screening.

1. 서론

사람세포의 핵 속에는 약 30개의 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) 단백질들이 있는데 이들은 hnRNP A1부터 hnRNP U까지 명명되어있다[1]. hnRNP들은 진핵세포의 핵 내의 RNA에 결합하여 RNA들의 안정화에 기여하고, hnRNP 단백질들 중 일부는 전사, pre-mRNA의 공정과정, mRNA의 세포질로의 이동 및 번역과정 등에 작용하는 것이 밝혀졌다[2].

hnRNP K 단백질은 중요한 hnRNP들 중 하나이며, 사람세포에 있는 hnRNP K는 463개의 아미노산으로 구성되어있고 68kDa를 나타낸다[3]. 이 단백질은 시토신이

많은 sequence에 잘 결합하는 것으로 알려져 있고, RNA-결합에 관여하는 motif인 KH (hnRNP K homology) domain을 3개 포함하고 있다[4]. hnRNP K는 핵단백질이 지만 핵 속에서만 머무르지 않고 핵과 세포질을 왕복하는 특징이 있고, 전사와 번역과정 및 mRNA의 안정성 조절 등에 작용할 것으로 제시되었다[5].

그러나 hnRNP K가 어떤 기전을 통하여 위의 조절과정에 작용하는지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않았다. 본 연구는 hnRNP K와 결합하는 세포내 인자를 찾아내고 두 단백질이 직접 결합하는 것을 밝혀냄으로써 hnRNP K의 작용 기전을 이해하는데 기여하고자 하였다. 이를 위해 이스트 two-hybrid 시스템을 이용하여 HeLa

¹선문대학교 건강과학대학 의생명과학과

*교신저자: 최미영(choimy@sunmoon.ac.kr)

접수일 08년 10월 27일

수정일 (1차 08년 11월 28일, 2차 08년 12월 05일)

게재확정일 08년 12월 16일

cDNA library를 스크리닝하였다. 그 결과 찾아낸 세포내 단백질이 hnRNP K와 직접 결합하는 지를 밝히기 위해서는 *in vitro* pull-down 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 균주

이스트 two-hybrid 시스템에서는 *Saccharomyces cerevisiae* HF7c를 형질전환의 숙주 세포로 사용하였다. HF7c의 유전형은 *MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh2, LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{trpA}-HIS3,URA3::GAL4_{17mers}(X3)-CyC1_{trpA}-lacZ*이다[6]. HF7c는 *his3* 유전자와 β -galactosidase 유전자를 레포트유전자로 포함하고 있고 *trp1, leu2 cyh2*를 표지 유전자로 가지고 있다[6]. 클로닝에 사용한 균주는 *E. coli* DH5a이고, 이스트세포에서 cDNA 클론을 포함하는 플라스미드 DNA를 분리해내는 실험에는 *E. coli* JBE181을 사용하였다.

2.2 플라스미드 및 플라스미드 제조

플라스미드 pGBT9와 pGAD424 및 pACT2는 Clontech Laboratories Inc.에서 구입하였다. 플라스미드 pGBT9는 DNA 결합부위 (DNA-binding domain, DB)를 제공하는 것으로 사용되었고, 플라스미드 pGAD424와 pACT2는 활성화부위 (activation domain, Ac)를 제공하는 것으로 사용되었다. 플라스미드 pGBT9/hnRNP L (1~558)과 pGAD424/hnRNP L (1~558)과 pGAD424/hnRNP K (1~463) 및 pGEX-KG/hnRNP K (1~463)는 포항공과대학 장승기교수로부터 제공받았다 [7,8]. 플라스미드 pGBKT7/hnRNP K (2~463)의 제조 방법은 Yoon and Choi [9]에 설명되어있다. 이스트 two-hybrid 스크리닝실험으로 찾아낸 클론들 중 클론 #15 인 pGAD10/hnRNP E1(61~356+3'UTR)은 hnRNP K 단백질과 hnRNP E1 단백질간의 상호결합에 대한 조사를 하는 실험에서 사용하였다. 플라스미드 pTM1/hnRNP E1(2~356)의 제조 방법은 Choi [10]에, 그리고 pALTER1-K (*wt*)의 제조 방법은 Siomi et al [4]에 설명되어있다.

2.3 이스트 two-hybrid 스크리닝 시스템

클로닝벡터와 이스트균주 및 HeLa cDNA library를 Clontech Laboratories Inc.에서 구입하여 사용하였고 이 회사에서 제안하는 방법에 따라 이스트 two-hybrid 스크

리닝 실험을 수행하였다. HF7c에 pGBKT7/hnRNP K (2~463)와 HeLa cDNA library를 함께 넣어 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 루이신과 트립토판 및 히스티딘이 결핍된 합성배지 (SD/-Leu/-Trp/-His 배지)에 잘 펼쳐준 후 배양하였다. SD/-Leu/-Trp/-His 배지에서 자라난 세포 (His^+ grower)를 필터 종이위에 옮기고 Yoon and Choi [9]에서 설명된 방법을 사용하여 β -galactosidase 활성을 조사하였다. His^+ 이면서 동시에 β -galactosidase⁺인 형질전환체 이스트세포를 루이신이 결핍된 합성배지에서 배양하여 library 플라스미드 DNA를 구제해 냈다. 각각의 library 플라스미드 DNA를 전기 침투법 (Electroporator II, Invitrogen)을 사용하여 대장균 균주 JBE181에 형질전환시킨 후 100 μ g/ml의 앰피실린을 포함하고 있고 루이신이 결핍된 배지에서 배양하였다. 형질 전환된 대장균세포를 앰피실린이 든 LB 배지에서 배양한 후 플라스미드 DNA를 정제하였다.

양성을 나타내는 cDNA 클론을 최종적으로 골라내기 위하여 각각의 library 플라스미드 DNA와 pGBT9/hnRNP K 플라스미드를 함께 HF7c 균주에 형질 전환시키고 SD/-Leu/-Trp/-His 배지에서 배양한 후 β -galactosidase 활성 분석실험을 통하여 *lacZ* 유전자와 *his3* 유전자가 발현한다는 것을 재확인하였다. 위의 결과를 바탕으로 *lacZ* 유전자와 *his3* 유전자의 발현이 재확인된 cDNA 클론 중에서 발현된 단백질 자체가 전사활성화 인자로 작용하지 않는 것, 즉 library 플라스미드 DNA와 pGBT9으로 형질전시킨 HF7C 세포는 His^+ 이면서 동시에 β -galactosidase⁻인 형질을 나타내는 클론만을 골라 양성 cDNA 클론으로 결정하였다. 양성 cDNA 클론의 염기서열 분석을 의뢰하고 (Bionex, Korea), 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 Nucleotide nucleotide-BLAST 프로그램으로 분석하여 cDNA 클론이 무엇인지를 찾아내었다.

2.4 박테리아에서의 GST-hnRNP K 단백질의 생성 및 GST-pull down assay

pGEX-KG/hnRNP K (1~463) 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS 세포에 0.5mM IPTG를 처리하여 GST-hnRNP K 단백질의 발현을 유도하였고, Yoon and Choi [9]에서 설명한 방법을 사용하여 단백질 용액을 얻었다. GST 단백질은 pGEX-KG 플라스미드를 가지고 있는 BL21(DE3)/pLysS 세포에서 동일한 방법으로 발현시키고 sonication하여 단백질 용액을 얻었다[9].

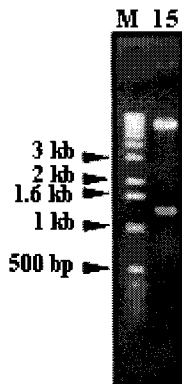
³⁵S-hnRNP E1과 ³⁵S-hnRNP K는 TNT SP6/T7 coupled reticulocyte lysate system [Promega]과 ³⁵S-labeled

methionine and cystein [Perkin Elmer Life Sciences, Inc.]을 이용하여 *in vitro* transcription/translation을 수행하여 얻었다. 이때 pTM1/hnRNP E1(2~356)과 pALTER1-K(*wt*) 플라스미드를 사용하였다. Choi [10]에서 설명한 방법을 사용하여 *in vitro* pull-down assay를 실시하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 HeLa cDNA library로부터의 hnRNP K와 결합하는 단백질을 암호화하는 cDNA 클론의 분리

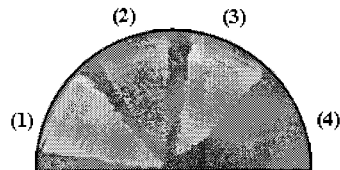
hnRNP K와 결합하는 세포내 단백질을 찾아내고자 hnRNP K cDNA를 Gal4-DB에 융합시켜서 이스트 two-hybrid의 미끼로 사용하였고 Gal4-Ac에 융합된 HeLa cDNA library를 스크리닝하였다. pGBT9/hnRNP K와 pGAD10/HeLa cDNA library 플라스미드 DNA를 HF7c에 형질전환시킨 후 약 1.5×10^6 개의 형질전환체 세포를 스크리닝 한 결과 *lacZ gene*과 *his3 gene*이 발현되어 His⁺이면서 동시에 β -galactocidase⁺ 활성을 나타내는 19가지 cDNA 클론을 얻었다. 이들의 염기서열을 분석한 결과 #15 클론은 사람의 hnRNP E1 (poly(rC) binding protein 1) cDNA (GenBank accession number XM_031585)를 포함한다는 것을 발견하였다. hnRNP E1 cDNA는 1632bp로 구성되어있고, nt#176과 nt#1242 사이에 356개의 아미노산으로 이뤄진 하나의 open reading frame (1071bp)을 포함하였다. #15 클론의 플라스미드를 *EcoR I*과 *Xho I*으로 절단한 후 0.8% 아가로스 젤에서 전기영동하여 cDNA의 크기를 조사하였다. 그림 1에서 보는 것처럼 클론 #15의 insert의 크기는 약 1300bp로 나타났다.



[그림 1] 제한효소 절단반응을 통한 cDNA 클론 #15의 분석 (M은 마커 DNA)

#15의 염기서열을 분석한 결과 이 클론은 hnRNP E1 cDNA의 nt#356부터 약 nt#1550까지 포함하고 GAL4-Ac와 동일한 프레임으로 연결되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이것은 hnRNP E1의 356개의 아미노산 중 61번 아미노산부터 356번 아미노산을 포함하고 있고 3'UTR의 일부도 포함하였다.

그림 2에서는 플라스미드 pGBT9/hnRNP K와 pGAD10/hnRNP E1(61~356+3'UTR)로 형질 전환시킨 HF7c를 SD/-Leu/-Trp/-His 배지에 배양하여 관찰하고 β -galactocidase 활성 분석 실험을 실시한 결과를 보여주고 있는데, *his3 gene*과 *lacZ gene*이 발현되는 것을 알 수 있었다. 여기서 *his3* 유전자가 발현되어 세포가 성장하는 것은 두 단백질이 서로 상호결합을 한다는 것을 의미한다 (그림 2 (3)). 이와는 대조적으로 pGBT9와 pGAD10/hnRNP E1(61~356+3'UTR) 플라스미드로 형질 전환시킨 HF7c로 동일한 실험을 실시하였을 때에는 레포트 유전자가 전혀 발현되지 않는다는 결과를 보였다 (그림 2 (4)). 그림 2의 (1)과 (2)는 양성대조군으로 사용되었다. 이 결과들은 이스트 two-hybrid system에서 hnRNP E1은 hnRNP K와 단백질-단백질 상호결합을 한다는 것을 제시하였다.



- (1) DB-hnRNP L (1~558) + Ac-hnRNP L (1~558)
- (2) DB-hnRNP K (2~463) + Ac-hnRNP L (1~558)
- (3) DB-hnRNP K (2~463) + Ac-hnRNP E1 (61~356)
- (4) DB + Ac-hnRNP E1 (61~356)

[그림 2] 이스트 two-hybrid를 활용한 hnRNP K와 hnRNP E1의 상호결합에 대한 분석

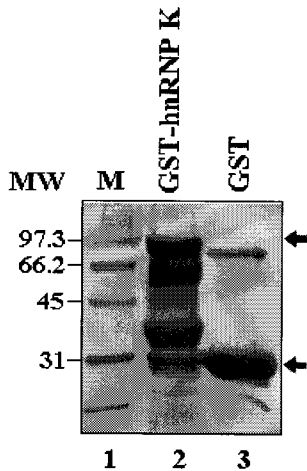
hnRNP E1 단백질은 α -globin mRNA-stabilizing factor로 알려져 있으며 poly(rC)에 잘 결합한다[11]. 또한 이 단백질에는 3개의 KH domain이 들어 있는데 RNA-binding activity를 제공한다[2].

이스트 two-hybrid system에서 hnRNP E1과 hnRNP K가 결합하는 것처럼 나타나는 현상은 두 단백질이 직접 결합할 때 생길 수 있다. 그러나 그러한 현상은 다른 분자가 매개하여 두 단백질이 간접적인 방법으로 결합할 때에도 일어날 수 있다. 즉, hnRNP K와 hnRNP E1에 포함되어 있는 각각의 RNA-binding domain에 이스트 세포의 핵내에 존재하는 RNA가 결합하여 hnRNP

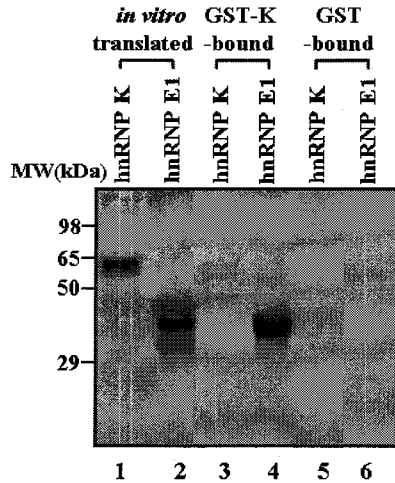
K-RNA-hnRNP E1과 같은 결합이 일어날 때에도 가능한 것이다. 지금까지의 실험에서는 두 단백질이 직접적인 결합을 하고 있는지 여부를 확인하는 것이 불가능하며, 다음 소절에서 설명하는 *in vitro* GST pull-down 실험을 통해서만 가능하다.

3.2 *in vitro* 에서의 hnRNP E1과 hnRNP K의 상호결합

hnRNP E1과 hnRNP K간에 직접적인 결합이 일어나는지를 확인하기 위해서 GST-hnRNP K 단백질을 사용하여 다음에 설명하는 과정을 따라 *in vitro* pull-down assay를 수행하였다. 먼저, GST-hnRNP K와 GST 단백질을 glutathione sepharose™4B resin에 결합시켰다. 그림 3은 12% SDS-PAGE를 통하여 Glutathione sepharose™4B resin에 결합된 GST-hnRNP K와 GST 단백질을 보여주고 있다. 그 다음, *in vitro* TNT transcription/translation coupled system을 이용하여 pTM1/hnRNP E1(2~356)과 pALTER1-K (*wt*) 플라스미드로부터 ³⁵S-hnRNP E1 단백질과 ³⁵S-hnRNP K 단백질을 합성하였는데, 두 단백질들은 그림 4의 lane 1과 2에서 나타나있다.



[그림 3] glutathione sepharose resin에 결합한 GST-hnRNP K와 GST 단백질



[그림 4] *in vitro* pull-down assay를 활용한 hnRNP K와 hnRNP E1의 상호결합에 대한 분석

그리고 나서 ³⁵S-hnRNP E1 단백질과 양성 대조군으로서 ³⁵S-hnRNP K 단백질을 resin에 결합되어 있는 GST-hnRNP K와 각각 반응시켰다. 이때 반응액 속에 RNase A와 RNase T1을 포함시켜 두 단백질간의 상호결합이 RNA를 매개로 하여 일어나는 가능성을 배제하였다. glutathione resin에 결합되어 있는 단백질들을 SDS-PAGE로 분리시킨 후 autoradiography로 관찰하였다. 대조군으로서 resin에 결합된 GST 단백질에 ³⁵S-hnRNP E1 단백질과 ³⁵S-hnRNP K 단백질을 넣고 위와 동일한 방법으로 반응시킨 후 glutathione resin에 결합되어 있는 단백질들을 조사하였다. 그림 4에서 나타난 것처럼 GST-hnRNP K는 ³⁵S-hnRNP E1과 결합하고 (lane 4) GST는 ³⁵S-hnRNP E1을 pull-down시키지 못하는 것을 보여주었다 (lane 6). 양성대조군으로서 ³⁵S-hnRNP K는 GST-hnRNP K와 약하게 상호 결합하였으나 GST와는 상호결합하지 않는다는 것을 보여주었다 (lane 3, 5). 이 결과들로 hnRNP E1 단백질은 hnRNP K에 직접적이며 특이적으로 (directly and specifically) 상호결합한다는 것을 알 수 있었다. 지금까지는 본 연구에서와 같이 이스트 two-hybrid 시스템이나 GST pull-down assay 등을 사용하여 hnRNP E1과 hnRNP K간의 직접적 결합을 조사한 연구 결과는 알려져 있지 않았다.

4. 결론

본 연구에서는 hnRNP K의 기능을 이해하기 위하여 먼저 이스트 two-hybrid 시스템을 사용하여 hnRNP K와

상호 결합하는 세포내 단백질을 찾아냈는데 그 중에는 hnRNP E1이 포함되어 있었다. 본 연구는 이 hnRNP E1 단백질이 이스트 two-hybrid 시스템에서 hnRNP K 단백질과 상호결합한다는 것을 보였다. 두 단백질이 직접적 특이적으로 상호 결합한다는 것 또한 *in vitro* pull-down assay 실험을 통하여 밝혀내었다.

두 단백질 hnRNP E1과 hnRNP K에는 다음과 같은 공통적인 특징이 있다는 것을 발견할 수 있었다. 즉, poly (rC)에 잘 결합하고 3개의 KH domain을 가지며, 핵과 세포질을 왕복하는 성질을 가지고[2], 특정 mRNA의 3'UTR에 있는 CU-rich sequence에 결합하여 mRNA stability와 translation을 조절한다[12]. 그들 두 단백질이 mRNA의 3'UTR에 있는 각각의 binding site에 결합하여 작용한다는 것은 알려져 있었지만, 두 단백질의 결합에 대해서는 알려져 있지 않았었다. 두 단백질이 직접적으로 결합한다는 것은 본 연구를 통해 밝혀졌다.

두 단백질에 대해 지금까지 보고된 특징과 본 연구를 통하여 밝혀진 사실을 가지고 두 단백질의 기능을 생각해 보면, hnRNP K와 hnRNP E1은 두 단백질의 직접적 특이적인 상호결합을 통하여 특정 mRNA의 세포질로의 transport, mRNA의 안정도 조절, mRNA의 번역 조절 과정에 함께 작용할 것으로 추론할 수 있다.

참고문헌

[1] G. Dreyfuss, M. J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C. G. Burd, "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA". *Annu. Rev. Bioche.*, Vol. 62, pp. 289-321. 1993. 12.

[2] A. M. Krecic and M. S. Swanson "hnRNP complexes: composition, structure, and function", *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol. 11, pp. 363-371. 1999. 10.

[3] M. J. Matunis, W. M. Michael and G. Dreyfuss "Characterization and primary structure of the poly (C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein", *Mol. Biol. Cell.*, Vol. 12, pp. 164-171. 1992. 6.

[4] H. Siomi, M. Choi, M. C. Siomi, R. L. Nussbaum, and G. Dreyfuss "Essential role for KH domains in RNA-binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome", *Cell*, Vol. 77, pp. 33-39. 1994. 4.

[5] K. Bomsztyk, O. Denisenko and J. Ostrowski J "hnRNP K: one protein multiple processes", *BioEssays*, Vol. 26, pp. 629-638. 2004. 6.

[6] H. E. Feilotter, G. J. Hannon, C. J. Ruddell, and D. Beach "Construction of an improved host strain for two hybrid screening", *Nucl. Acids Res.*, Vol. 22, pp. 1502-1503. 1994. 8.

[7] B. Hahm, O. H. Cho, J. E. Kim, Y. K. Kim, J. H. Kim, Y. L. Oh, and S. K. Jang "Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L", *FEBS Letters*, Vol. 425, pp. 401-406. 1998. 10.

[8] J. H. Kim, B. Hahm, Y. K. Kim, M. Choi, and S. K. Jang, "Protin-Protein Interaction Among hnRNPs Shuttling Between Nucleus and Cytoplasm" *J. Mol. Biol.* Vol. 298, pp. 395-405. 2000. 6.

[9] J-Y. Yoon and M. Choi. "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K", *Genes and Genomics*, Vol. 30, pp. 419-426. 2008. 8.

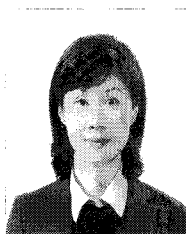
[10] M. Choi. "hnRNP E1 interacts with hnRNP L", *Genes and Genomics*, Vol. 30, pp. 355-363. 2008. 8.

[11] M. Kiledjian, X. Wang and S. A. Liebhaber, "Identification of two KH domain prteins in the α -globin mRNP stability complex", *EMBO J.* Vol. 14, pp. 4357-4364. 1995. 6.

[12] B-J. Thiele, A. Doller, T. Kahne, R. Pregla, R. Hetzer, and V. Regitz-Zagrosek, "RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis", *Circ. Res.* Vol. 95, pp. 1058-1066. 2004. 10.

최 미 영(Mieyoung Choi)

[정회원]



- 1983년 2월 : 서울대학교 사범대학 생물교육학과 (이학사)
- 1985년 2월 : 서울대학교 대학원 동물학과 (이학석사)
- 1992년 12월 : University of Chicago 발생생물학과 (이학박사)

- 1993년 1월 - 1995년 12월 : University of Pennsylvania, Howard Hughes Medical Institute, Research Associate
- 1996년 : 서울대학교 분자생물학과 시간강사
- 1997년 - 현재 : 선문대학교 의생명과학과 부교수

<관심분야>

RNA-결합 단백질의 유전자 발현 조절에서의 기능, 핵과 세포질을 왕복하는 단백질의 기능