

Nrg1 is a Transcriptional Repressor for the Expression of Genes involved in Glucose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

Hyen Sam Kang

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, SNU

효모에서 배지에 glucose가 존재할 경우 여러 유전자들의 발현이 억제되어 지는데, 이러한 현상을 포도당 억제현상이라고 한다. 효모의 포도당 억제 기작은 세균에서 연구된 carbon catabolite repression 과는 달리, 특정 DNA 결합 단백질에 의한 target promoter와 직접적인 상호작용을 통해서 일어나는 것으로 알려져 있다.

효모에서의 glucose repression 기작은 대부분 포도당 존재시 발생하는 신호들이 연속적인 신호 전달 체계를 통하여 세포내로 전달되어 target gene의 transcription level을 억제함으로써 이루어지는 것으로 보고되어 졌다. 그 기작중의 하나는 target 유전자에 직접적인 억제를 일으키는 repressor를 encoding하는 억제 유전자들에 의해 이루어지며, 또 다른 하나는 target 유전자를 활성화하는 activator를 방해함으로써 이루어지는 것으로 보고되었다.

효모에서 녹말을 분해하는 효소를 encoding하고 있는 유전자의 발현은 이러한 포도당 억제 현상에 의해서 조절을 받는다. 본 연구진은 이러한 glucoamylase 효소를 encoding하는 *STA1* 유전자의 발현을 억제하는데 관여하는 전사억제인자를 찾아내고 이를 Nrg1으로 명명하였다. 효모의 cyclic AMP-dependent protein kinase를 encoding하고 있는 *TPK2* 유전자가 *STA1* 상위조절인자에 의해서 조절받도록 제작된 plasmid를 사용하면, derepressed condition에서는 *TPK2* 유전자가 높은 수준으로 발현이 되고 이로 인한 toxic effect에 의해서 죽게된다. 그러나 이러한 조건에서 *NRG1* 유전자가 multicopy로 존재할 경우엔 *STA1* 유전자의 상위조절부위와 작용하여 *TPK2* 유전자의 발현이 억제되고, 따라서 pRPS50 효모의 정상적인 성장을 가능하도록 하며 (Figure 1), 이때의 glucoamylase의 생성은 *Sta+* 균주에 비해서 현저하게 감소된다 (Table 1).

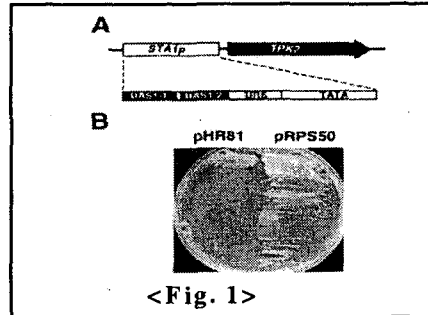


TABLE 1. Suppression of glucoamylase production by plasmid pRPS50

Plasmid	Glucoamylase activity (U)	Sta ⁺ phenotype
pHR81	14.5	++++
pRPS50	7.2	++

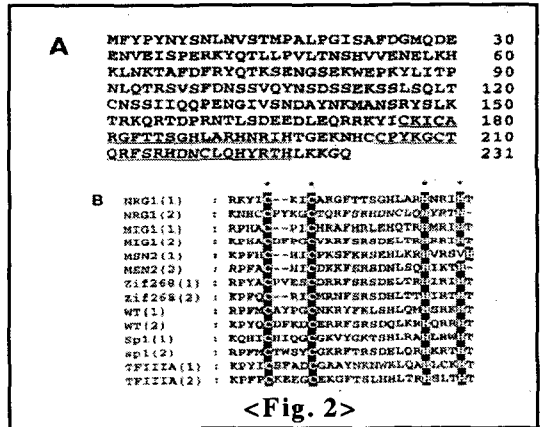
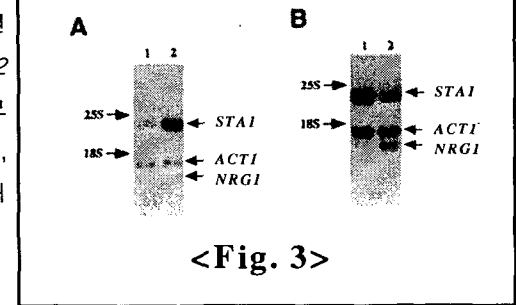
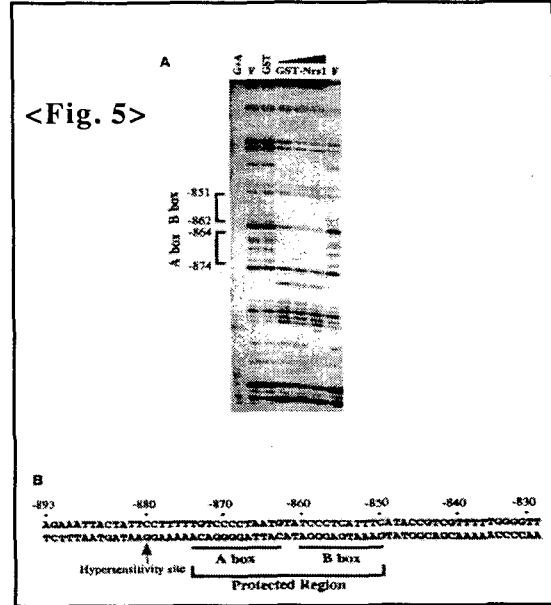
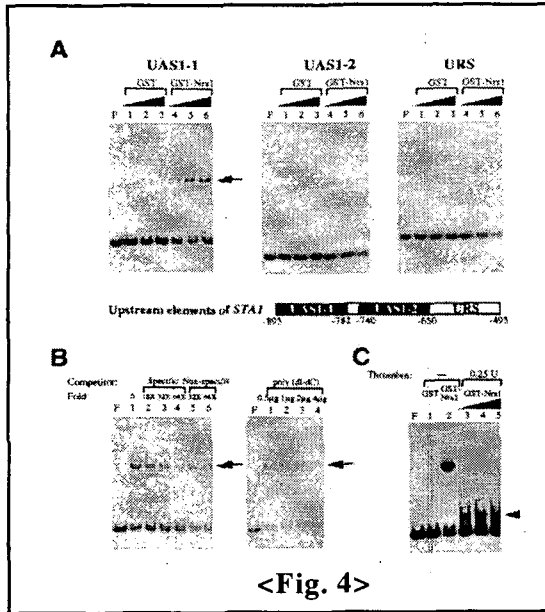


TABLE 2 Effects of *nrg1* disruption and carbon sources on *STA1* gene expression

Strains	Glucoamylase activity (U)	
	Repressed	Derepressed
AN20-5b (wildtype)	22	135
FM20-5b (<i>nrg1</i> Δ)	108	126

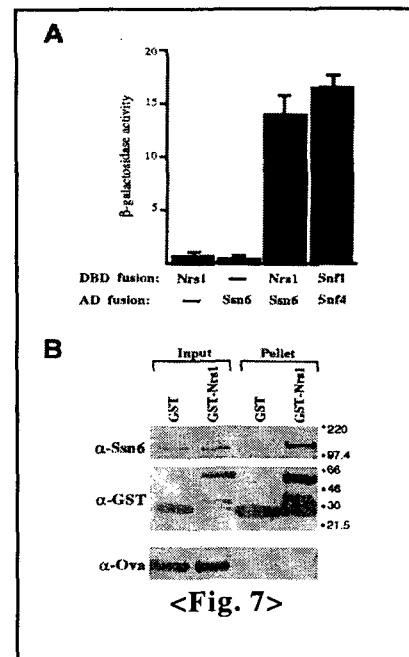




NRG1 유전자는 *STA1* 유전자의 상위활성조절 부위 중 두 부분에 결합하는 25kDa의 Zinc finger protein을 encode하고 있다 (Figure 2). *NRG1* 유전자를 제거시킨 돌연변이균주에서는 포도당 존재 시에 glucoamylase 활성이 현격히 증가하고 (Table 2), *STA1* transcript의 level이 5배 증가하는 것을 확인할 수 있다 (Figure 3-A). *NRG1* 유전자 자체의 발현은 포도당이 존재하지 않는 경우에는 억제되어진다 (Figure 3-B). zinc finger motif를 지닌 Nrg1이 DNA-binding 단백질로서 *STA1* 유전자의 상위조절부위 중 특정부위에 결합을 한다는 것을 정제된 GST-Nrg1 fusion 단백질을 이용한 Gel-retardation assay를 통해서 확인하고 (Figure 4), 그 정확한 결합부위를 DNase I footprinting 실험을 통해서 밝혀내었다 (Figure 5).

<Fig. 6>

Relevant Genotype	Expressed Proteins	Carbon Sources	<i>CYC1/LacZ</i> Reporter		Fold Repression
			UAS	UAS	
WT	LexA1-87	glucose	355	166	2.2
	LexA-Nrs1		437	41	10.7
	LexA-Mig1		475	35	14.2
WT	LexA1-87	glycerol	1495	545	2.7
	LexA-Nrs1	ethanol	2036	670	3.0
	LexA-Mig1		1381	657	2.1
<i>ssn6Δ</i>	LexA1-87	glucose	101	40	2.2
	LexA-Nrs1		113	44	2.5
<i>up1Δ</i>	LexA1-87	glucose	55	24	2.3
	LexA-Nrs1		58	26	2.2



Nrg1은 *STA1* 유전자의 상위조절부위 중 UAS1-1의 두 부분에 결합을 한다. -864부터 -874까지의 A box와 -851부터 -862까지의 B box이다. A box의 CCCCT 염기서열과 B box의 CCCTC 염기서열이 Nrg1이 DNA에 결합하는데 중요한 부분이 될 것으로 생각되어진다. LexA-Nrg1 fusion 단백질을 reporter 유전자인 *CYC1-lacZ* 앞에 4 lexA operators에 강제로 결합시켜준 경우 포도당이 존재할 때, lexA operator가 없는 경우에 비해 10.7배나 reporter 유전자의 발현이 감소하였다 (Figure 6). *ssn6* 그리고 *tup1* 돌연변이균주에서는 이러한 억제 현상이 나타나지 않았고, 따라서 LexA-Nrg1에 의한 억제현상에는 Ssn6와 Tup1이 필요하다는 것을 확인할 수 있다. 그리고 Two-hybrid와 glutathione S transferase pull-down 실험을 통해서 Nrg1과 Ssn6가 결합함을 in vivo와 in vitro로 확인하였다 (Figure 7).

이상의 실험 결과들은 Nrg1 단백질이 Ssn6-Tup1 complex와 결합하여 *STA1* 유전자의 포도당억제에 관여하는 주요한 DNA-binding 억제인자임을 제시한다. 요약하면 포도당이 *NRG1* 유전자의 발현을 유도하고, Nrg1 단백질이 *STA1* 유전자의 상위부분인 UAS1-1에 먼저 결합한 후 general repressor complex인 Ssn6-Tup1을 끌어당겨서 궁극적으로 효모의 RNA polymerase II가 *STA1* 유전자의 promoter (TATA box) 에 결합하는 것을 방해함으로써 *STA1* 유전자의 전사를 억제한다 (Figure 8).

