

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 Dna2 helicase/endonuclease와 YHR122W 단백질의 상호작용

이현선<sup>†</sup> · 최도희<sup>†</sup> · 권성훈 · 김나연 · 이인환 · 김현정 · 배성호\*  
인하대학교 자연과학대학 생명과학과

*Saccharomyces cerevisiae* Dna2 helicase/endonuclease는 진핵세포 DNA 복제과정의 Okazaki fragment processing에서 RNA primer를 제거하는데 필수적인 역할을 한다. Genome-wide scale의 면역침전 실험결과, 기능이 알려져 있지 않은 단백질인 YHR122W가 Dna2 단백질과 상호작용한다고 예측되었다 (1). 본 연구에서는 이를 확인하기 위하여 YHR122W 유전자를 효모에서 과발현시킨 결과, dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 온도감수성 표현형이 억제되는 유전학적 상호작용을 관찰하였다. YHR122W 단백질이 Dna2 단백질과 직접적인 상호작용을 하는지 확인하기 위하여 YHR122W를 대장균에서 재조합 단백질로 발현시키고 단백질을 정제하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay를 통한 분석에서 YHR122W 단백질과 Dna2 단백질 사이의 상호작용을 확인하였다. 뿐만 아니라 YHR122W-Dna2 상호작용은 생리적 염도인 150 mM NaCl 농도에서 가장 강한 결합을 보였다. 이러한 유전학적 상호작용과 물리적인 상호작용은 YHR122W가 생체내에서 Dna2의 기능과 밀접한 연관이 있을 가능성을 제시하고 있다.

**Key words** □ DNA replication, Dna2, Okazaki fragment processing, YHR122W

### 서 론

*Saccharomyces cerevisiae* Dna2 유전자는 효모의 생장에 필수적인 Dna2 endonuclease/helicase 효소를 암호화한다(2, 3, 4). Dna2 단백질은 172 kDa으로 3 개의 domain으로 되어 있는데, endonuclease domain과 helicase domain이 각각 가운데 부분과 C-말단 부분에 각각 위치하고 있으며, N-말단의 405 개의 아미노산으로 이루어진 domain은 효소의 DNA 결합을 도와주는 역할을 하는 것으로 추측되고 있다(5, 6). Dna2 endonuclease 효소 활성은 single-stranded(ss) DNA에 특이적으로 작용하며 진핵생물 DNA 복제에서 Okazaki fragment에 존재하는 RNA-DNA primer를 제거하는 역할을 한다(7, 8). DNA polymerase  $\delta$ 가 lagging strand DNA를 합성하다가 먼저 만들어진 Okazaki fragment의 RNA-DNA fragment를 만나면 이를 밀어내면서 계속 DNA를 합성하여 RNA를 포함하는 ssDNA flap이 생기는데 Dna2 endonuclease는 이를 자르는 역할을 한다. Dna2 helicase는 ssDNA 상에서 5'에서 3' 방향으로 이동하면서 DNA 이중나선을 툰다. 이 효소활성은 DNA polymerase  $\delta$ 에 의해서 생성되는 ssDNA flap이 길어지면서 일시적으로 생길 수 있는 DNA 이차 구조를 풀어주어 Dna2 endonuclease의 작용을 도와주는 역할을 할 것으로 추측된다(9).

Dna2 endonuclease는 ssDNA flap을 완전히 제거하지 못하고 5-7 개의 짧은 nucleotide 단편이 남기 때문에 진핵생물의 Okazaki fragment processing에는 Dna2외에 Fen-1 nuclease가 더 필요하다(7, 8). Dna2 효소활성은 진핵생물의 ssDNA 결합 단백질인 replication protein A(RPA)에 의해 촉진된다. *In vitro* 실험에서 RPA는 Dna2 단백질과 상호작용하며 Dna2 endonuclease와 helicase 활성을 모두 촉진하는 것이 관찰되었다(8, 9). Okazaki fragment processing 과정에서 RPA는 DNA polymerase  $\delta$ 에 의해 생성되는 ssDNA flap에 결합하고 Dna2를 끌어들여 효소 활성을 촉진함으로써 RNA-DNA primer가 제거되도록 한다. 뿐만 아니라 RPA는 Dna2와 Fen-1이 순차적으로 작용하도록 함으로써 긴 ssDNA flap이 생성되더라도 Dna2가 먼저 ssDNA를 자르고 이어서 Fen-1이 남은 짧은 flap을 잘라서 ligation이 가능한 nick을 형성할 수 있도록 한다(8).

Dna2는 사람, 개구리, 식물, 어류, 선충류에 이르기까지 잘 보존되어 있으나 각 단백질마다 효소활성 정도가 다양하다(10-14). 예를 들어 *S. cerevisiae*의 Dna2는 helicase 활성과 endonuclease 활성을 모두 가지고 있으나 *Xenopus laevis* Dna2는 endonuclease 활성은 지니고 있지만 helicase 활성은 관찰되지 않는다(10). *Schizosaccharomyces pombe* Dna2는 helicase 활성과 endonuclease 활성이 모두 결여되어 있다(unpublished data). *Caenorhabditis elegans* Dna2는 *S. cerevisiae* Dna2 보다 10배 이상 높은 효소활성을 보일뿐만 아니라 짧은 ssDNA (<10 nt)에도 잘 작용한다(11). Dna2 단백질 1차 구조는 endonuclease domain과 helicase domain은 잘 보존되어 있으나, N-말단 부분은 생체내에 상동

<sup>†</sup>Both authors contributed equally to this work.  
\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 032-860-7712, Fax: 032-874-6737  
E-mail: sbae@inha.ac.kr

성도 적으며 크기도 다양하다. *S. cerevisiae*나 *S. pombe* Dna2는 350-400 개의 아미노산으로 이루어진 N-말단을 가지고 있는 반면, 후생동물의 Dna2 N-말단은 더 짧거나 결실되어있다(5). 효모에서 이 N-말단 domain이 없다면 in vitro 효소활성에는 아무런 영향을 주지 않지만, 이 부분이 결여된 돌연변이 효모(dna2 $\Delta$ 405N)는 37°C에서 자라지 못하는 온도 감수성 표현형이 나타난다(6). 이러한 결과로부터 N-말단 부분은 효소가 최대 활성을 나타내는데 필요할 것이라고 추측된다.

Dna2와 상호작용하는 단백질은 RPA 이외에는 아직 실험적으로 확인된 것이 없다. 최근 genome-wide scale의 면역침전 실험 결과, RPA, Lcd1, 그리고 YHR122W이 Dna2와 상호작용할 것이라고 예측되었다(1). Lcd1은 checkpoint 조절에 관여하는 단백질이다(15). YHR122W은 기능이 알려져 있지 않은 유전자로서 효모의 성장에 필수적인 유전자이며(16), 이 유전자로부터 암호화되는 단백질의 homolog는 모든 진핵 생물에서 발견된다. BLASTP 프로그램을 이용하여 효모의 YHR122W 단백질을 인간의 homolog와 비교하면 identity와 similarity가 각각 52%와 69%로 매우 높은 유사성을 보이며 다른 진핵생물의 homolog 단백질들과도 비슷한 정도의 유사성을 보인다(data not shown). 이러한 높은 유사성으로부터 이 단백질의 기능이 모든 진핵생물에서 잘 보존되어 있을 것이라고 추측할 수 있으며, 효모의 성장에 이 유전자가 필수적인 것으로 보아 진핵생물이 살아가는데 없어서는 안 되는 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. YHR122W 단백질이 Dna2와 상호작용할 것으로 예측되었으므로 이 단백질의 기능을 연구하기 위해서는 먼저 Dna2와의 상호작용을 확인할 필요가 있다. 본 연구에서는 YHR122W 유전자를 과량 발현시켜 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 온도감수성을 억제하는 유전학적 상호작용을 관찰하였으며, 정제된 단백질을 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 두 단백질간의 직접적인 상호작용을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 YHR122W 단백질이 생체내에서 Dna2와 상호작용하며 Dna2 기능과 어떤 연관성이 있을 것으로 추측된다.

## 재료 및 방법

### YHR122W 유전자 Cloning

*S. cerevisiae*의 genomic DNA에서 PCR 방법으로 YHR122W 유전자를 증폭하였다. PCR primer의 sequence는 다음과 같다: YHR122-1, 5'-CGC GGA TTC CAT ATG TCT GAG TTT TTG AAT GA-3'; YHR122-3, CGC GGA TCC AAA GTG CTA CAT GAG GGA AG-3'; YHR122-4, 5'-CGC CTC GAG TTA CTT ACA AGT CAC TAA CA-3'; YHR122-7, 5'-CCG CTC GAG CTT ACA AGT CAC TAA CAT CT-3'. 밑줄 친 부분은 각각 5' 쪽의 *Nde*I, *Bam*HI 인식자리와 3' 쪽의 *Xho*I 인식 자리를 나타낸다. 대장균에서 YHR122W를 발현시킬 수 있는 plasmid (pCH-YHR122W)를 만들기 위하여, primer YHR122-1과 YHR122-7을 사용하여 PCR 방법으로 증폭한 DNA를 *Nde*I과 *Xho*I로 자르고 pET21a (Novagen, USA)의 *Nde*I-*Xho*I 자리에

cloning하여 유전자의 3' 끝에 histidine tag를 붙였다. 효모에서 YHR122W 유전자를 발현시키기 위하여, primer YHR122-3와 YHR122-4를 사용하여 ORF의 5' 앞쪽으로 약 400 bp를 포함하는 DNA 조각을 PCR 증폭하고 pRS325의 *Bam*HI과 *Xho*I 자리에 cloning하여 pRS325-YHR122W를 제조하였다.

### 단백질 정제

Dna2 단백질은 이전 연구를 통해 본 연구실에서 확보하고 있는 단백질을 사용하였다(4, 7).

YHR122W 단백질을 발현시키기 위하여 pCH-YHR122W로 형질전환한 대장균 BL21(DE3)을 ampicilin (50  $\mu$ g/ml)을 포함한 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)에서 OD 0.5 까지 배양한 후 IPTG를 1 mM 되게 첨가하고 4시간 동안 30°C에서 배양하여 단백질을 발현시켰다. 배양액 (2 L, 500 ml  $\times$  4)을 5000 rpm 에서 15분간 원심분리하여 세포를 수확한 후 50 ml의 T100 완충용액(25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10% glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mM Benzamidine, 0.02% NP-40)에 현탁하였다. 본 논문에서 T 완충용액에 아래 첨자로 표시한 숫자는 NaCl의 농도(mM)를 나타낸다. 현탁액을 초음파 분쇄기를 사용하여 2분 간격으로 30초씩 10회 초음파를 가하여 세포를 분쇄한 후, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 조효소(crude extract)를 제조하였다.

조효소에 NaCl을 500 mM, 그리고 imidazole을 5 mM 되게 첨가하고 Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column (5 ml, Invitrogen)에 0.33 ml/min의 속도로 흘려주었다. Column을 T<sub>500</sub> (+ 5 mM imidazole) 20 ml 과 T<sub>100</sub> (+ 20 mM imidazole) 20 ml 로 차례로 세척한 후, T<sub>100</sub> (+ 200 mM imidazole) 35 ml을 흘려주어 단백질을 용출하였다. 용출된 각 분획을 SDS-PAGE와 Western 분석으로 YHR122W가 들어있는 분획을 확인하였다. YHR122W가 들어있는 분획들을 모아서 1 mM EDTA와 1 mM DTT를 포함하는 T100 완충용액으로 충전된 heparin Sepharose column (2 ml, Amersham Biosciences)에 0.1 ml/min의 속도로 흘려주었다. Column을 같은 완충용액 10 ml로 세척한 후, T<sub>500</sub> 완충용액으로 단백질을 용출하였다. YHR122W 단백질은 T<sub>500</sub> 완충용액으로 용출한 분획에 포함되어 있었으며, 이 분획들을 모아서 염도가 100 mM이 되게 T<sub>0</sub> 완충용액으로 투석한 후, T<sub>100</sub> 완충용액으로 충전되어있는Q-Sepharose column (2 ml, Amersham Biosciences)에 0.1 ml/min의 속도로 시료를 흘려주었다. Column을 같은 완충용액 10 ml로 세척한 후, T 완충용액에서 100-500 mM NaCl 기울기로 단백질을 용출하였다. YHR122W는 250 mM NaCl 농도에서 용출되었다. 용출된 단백질을 12% SDS-PAGE와 anti-His antibody (1:5000 희석, Invitrogen)를 이용한 Western 분석으로 YHR122W 단백질이 들어있는 분획들을 확인하고 -70°C에 보관하여 이후의 실험에 사용하였다.

### ELISA

YHR122W 단백질을 20 mM Na-phosphate 완충용액(pH7.0)으로 70 nM (1.75  $\mu$ g/ml) 되게 희석하여 microtiter well에 25°C에

서 2 시간동안 흡착시켰다. 0.3% BSA를 첨가한 후 1 시간동안 더 방치하여 microtiter well에 단백질이 포화상태로 흡착되도록 하였다. YHR122W 단백질이 부착된 well에 50 mM Tris 완충용액(pH 7.8, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.02% NP-40, 3% BSA)으로 희석한 Dna2 단백질을 여러 가지 농도 (0-20 nM, 0-3.4 µg/ml)로 첨가하고 25°C에서 1 시간동안 반응하였다. 각 well을 같은 완충용액으로 3번 세척한 후, Dna2에 대한 polyclonal 항체(rabbit antibody, 1:5000 희석, 4)를 첨가하고 25°C에서 1 시간동안 방치하였다. 다시 같은 완충용액으로 3번 세척하고 HRP conjugated anti-rabbit IgG (1:5000 희석, Amersham Biosciences)를 첨가하고 1시간 더 방치하였다. 각 well을 3번 세척한 후, YHR122W-Dna2 단백질 복합체를 검출하기 위하여 ABTS (Roche)를 사용하여 발색반응을 일으킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### YHR122W 과량발현에 의한 dna2Δ405N 돌연변이의 온도 감수성 표현형 억제

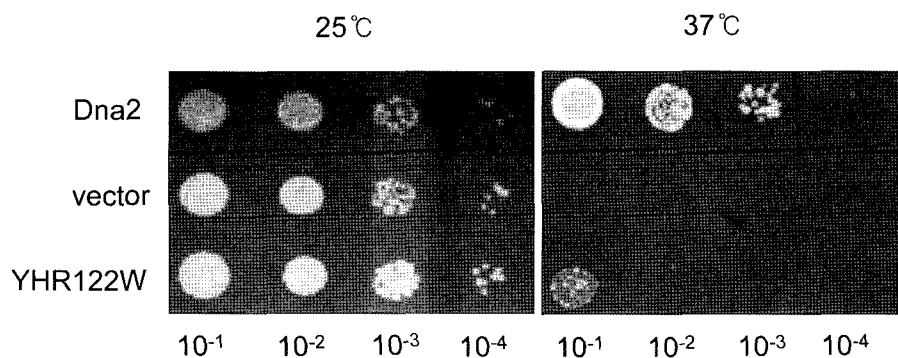
YHR122W와 Dna2 단백질사이의 상호작용을 조사하기 위하여 먼저 유전학적인 방법을 사용하였다. Dna2는 RPA 단백질과 상호작용하며 dna2Δ405N 돌연변이의 온도감수성이 RPA 단백질의 과량발현에 의해 억제된다는 것이 알려져 있다(8). 여기에 착안하여 만약 YHR122W가 RPA처럼 Dna2 돌연변이에 대한 억제유전자로 작용한다면 YHR122W와 Dna2 사이의 직접적인 상호작용이 있을 것으로 판단하고 이를 조사하였다. dna2Δ405N 돌연변이를 유전자형으로 가지고 있는 효모(YJA2, MATa, ade2, ura3, lys2, trp1, his3, leu2, GAL<sup>+</sup>, dna2Δ::dna2Δ405, 5)를 야생형 Dna2 유전자 또는 dna2Δ405N 유전자를 cloning한 pRS325 벡터로 형질전환한 후, 온도감수성을 조사하였다(Fig. 1). pRS325 벡터는 2 µ 복제 원점을 가지고 있어서 효모에서 수십 copy로 존재할 수 있는 plasmid이다. 따라서 이 벡터에 cloning

한 유전자는 염색체에 한 copy만 존재하는 경우보다 단백질 발현 양이 훨씬 많아지게 된다. 벡터만으로 형질전환한 균주(pRS325)는 37°C에서 성장하지 못하는 데 반하여, 야생형 Dna2 유전자로 형질전환한 균주(pRS325-Dna2)의 경우, 37°C에서 정상적인 성장을 보였다(Fig. 1). YHR122W 유전자를 과량발현시킨 경우(pRS325-YHR122W), 매우 미약하지만 항상 대조군(vector)에 비하여 어느 정도 성장회복을 보였다. 세 가지 균주 모두 25°C에서는 성장의 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 YHR122W 단백질이 많아지면 Dna2 효소의 결함을 직접적 또는 간접적으로 상쇄시킬 수 있다는 것을 말하고, 따라서 YHR122W 단백질의 생체내 기능이 Dna2의 기능과 연관성이 있을 것이라고 추측된다.

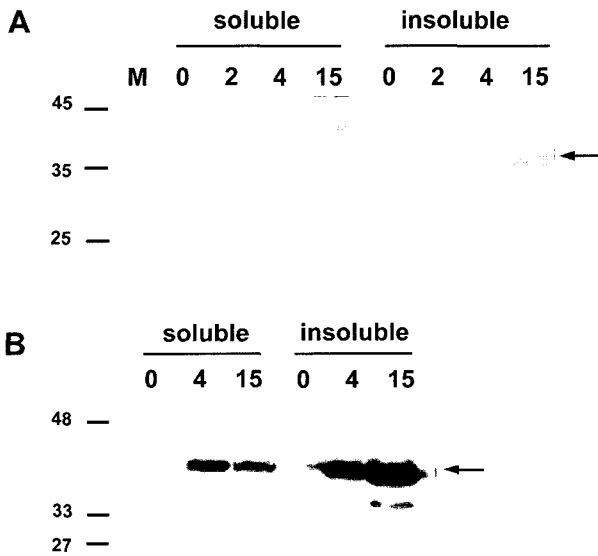
#### YHR122W 단백질 정제

대장균에서 YHR122W 단백질을 과량발현시키기 위해서 배양액에 IPTG 1 mM을 첨가하고 시간에 따른 단백질의 발현 양을 anti-penta His antibody (Invitrogen)를 사용한 Western 분석으로 조사하였다. 효모의 YHR122W 단백질은 231 개의 아미노산으로 이루어져 있으며 계산상의 분자량은 25,675 Da로 예측되지만, Western 분석에서 나타나는 band의 분자량은 약 40 kDa로 측정되었다(Fig. 2). 이것은 YHR122W 단백질이 이유는 알 수 없지만 SDS-PAGE에서 실제 분자량보다 매우 느리게 이동하기 때문으로 추측된다. IPTG에 의한 발현유도는 30°C에서 4시간일 때 수용성의 YHR122W 단백질이 가장 많은 것으로 관찰되었으며 그 이후로는 시간이 지날수록 전체 단백질 양은 증가하지만 YHR122W는 침전으로 가는 양이 더 증가하고 수용성 단백질은 오히려 줄어들었다(Fig. 2). 따라서 YHR122W 단백질을 정제하기 위한 대량 배양에서는 30°C에서 4시간동안 IPTG로 발현을 유도하였다.

단백질 정제를 위하여 총 2 L (500 ml × 4)를 배양하였으며, Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose, heparin-Sepharose, Q-Sepharose column을 차례로 사용하여 단백질을 정제하였다. Histidine tag이 붙은 재조합 YHR122W 단백질 중 약 절반 정도는 Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose



**Fig. 1.** Suppression of the temperature-sensitive phenotype of the dna2Δ405N mutant allele by overexpressing YHR122W gene. The dna2Δ405N mutant (YJA2) strain was transformed with pRS325 alone (vector) or pRS325-derived plasmids expressing either wild-type Dna2 (Dna2), or YHR122W protein (YHR122W). Ten-fold serial dilutions of each liquid culture of the resulting transformant were spotted in duplicate onto the synthetic media lacking leucine. Cells were grown for 3 days at 25°C and 37°C.

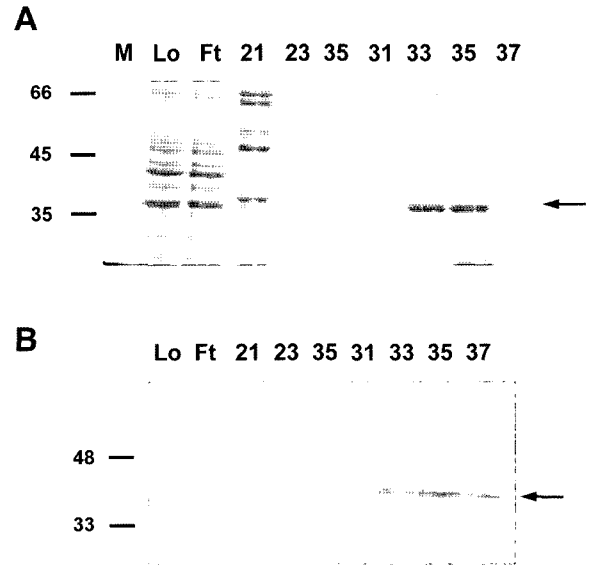


**Fig. 2.** Western blot analysis of the recombinant YHR122W protein. An *E. coli* strain, BL21(DE3), transformed with pCH-YHR122W was grown in LB medium (10 ml) and the YHR122W gene was induced by addition of 1 mM IPTG. Aliquots (1.5 ml) were taken at the indicated time (0, 2, 4, and 15 h) and cells were disrupted by sonication. The soluble and insoluble fractions separated by centrifugation were analyzed by 12% SDS-PAGE. The gel was Coomassie-stained (A), or analyzed by Western blot analysis with anti-his antibody (B). An arrow indicates the position of YHR122W protein.

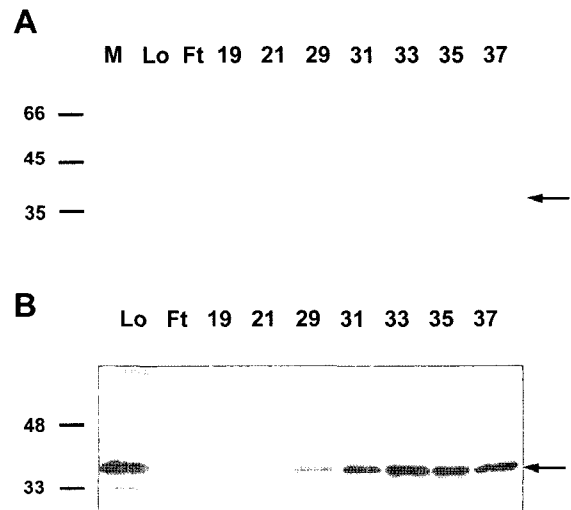
column에 결합하지 않고 flow-through 분획에서 발견되었는데 (Fig. 3), 이렇게 column을 빠져나온 제조합 단백질은 구조가 제대로 형성되지 않은 단백질일 것으로 추측된다. Column에 결합한 YHR122W 단백질은 200 mM imidazole에 의해 용출되었으며, 이를 모아서 heparin-Sepharose column과 Q-Sepharose column을 통하여 단백질을 더 정제하였다. Q-Sepharose column으로 최종 정제된 단백질은 95% 이상의 순도를 보였으며 Western 분석에서 다른 band는 검출되지 않았다(Fig. 4). 이 중에서 33번 분획을 이후의 ELISA 실험에 사용하였다.

**ELISA를 이용한 Dna2와 YHR122W의 상호작용 조사**

순수분리한 Dna2 단백질과 YHR122W 단백질의 상호작용을 조사하기 위해 YHR122W를 microtiter plate에 70 nM (1.75 µg/ml)의 농도로 고정시키고 150 mM NaCl 농도에서 여러 농도의 Dna2를 첨가하여 재료 및 방법에 서술한 대로 ELISA를 수행하였다. 대조군으로 BSA를 고정시킨 경우는 거의 상호작용이 관찰되지 않는 반면, YHR122W의 경우 Dna2의 농도가 증가함에 따라 점점 더 강한 상호작용을 보였다(Fig. 5). 네 번의 실험에서 모두 비슷한 결과를 얻었으며 Fig. 5는 그 평균값을 그래프로 나타내었다. YHR122W와 Dna2의 상호작용이 단순히 단백질 표면에 있는 전하를 띤 아미노산 사이의 전기적인 상호작용일 가능성을 배제할 수 없기 때문에 염도에 의한 상호작용의 변화를 조사하였다. 만약 단순한 전기적인 상호작용이라면 ionic strength가

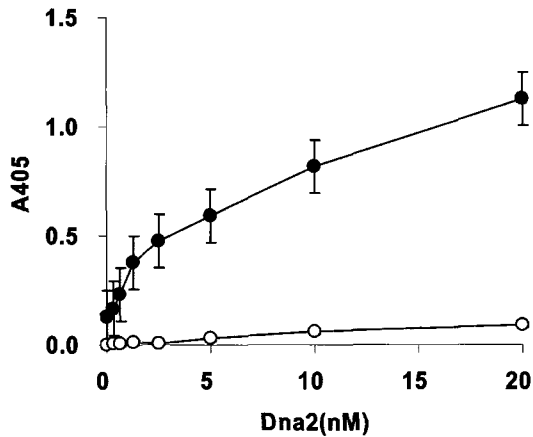


**Fig. 3.** Separation of YHR122W protein by the Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column chromatography. SDS-PAGE (12%) of the Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column fractions (5 µl) was performed, and the gel was stained with Coomassie (A) or analyzed by Western blot analysis (B). The Load (Lo), flow-through (Ft), and fractions analyzed are indicated at the top of the figure. M indicates protein molecular size markers. An arrow indicates the position of YHR122W protein.



**Fig. 4.** Separation of YHR122W protein by the Q-Sepharose column chromatography. SDS-PAGE (12%) of the Q-Sepharose column fractions (5 µl) was performed, and the gel was stained with Coomassie (A) or analyzed by Western blot analysis (B). The Load (Lo), flow-through (Ft), and fractions analyzed are indicated at the top of the figure. M indicates protein molecular size markers. An arrow indicates the position of YHR122W protein.

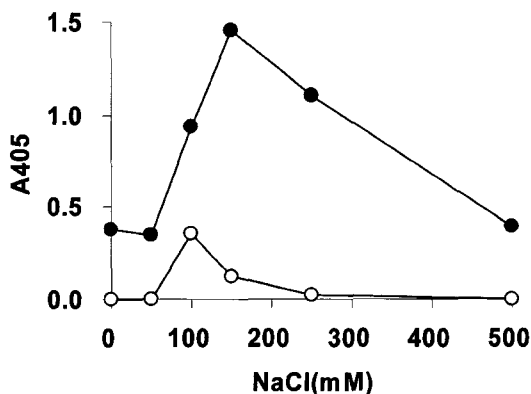
커질수록 상호작용은 약해져야 할 것이다. 그런데 두 단백질간의 상호작용은 NaCl의 농도가 낮을 때보다 150 mM 정도에서 가장 강한 상호작용을 보였다(Fig. 6). 이것은 두 단백질의 결합이 단



**Fig. 5.** Interaction between YHR122W and Dna2 analyzed by ELISA. Microtiter wells coated with either YHR122W protein (●) or BSA (○) were incubated with 200  $\mu$ l of increasing amount of Dna2 (0-20 nM, 0-3.4  $\mu$ g/ml) and ELISA was performed as described in materials and methods. A405, absorbance at 405 nm. The mean of four independent experiments and the standard deviations are shown.

순한 전기적인 결합이 아니라는 것을 보여주는 결과이다. 그러나 NaCl의 농도가 더 올라가면 급격히 상호작용이 줄어드는 것으로 보아 YHR122W와 Dna2 단백질의 결합은 비교적 약한 결합이라고 생각된다. 일반적으로 세포내의 생리적인 염도가 125-150 mM 정도이므로 150 mM NaCl에서 가장 강한 결합을 보이는 것은 두 단백질이 실제로 생체내에서 상호작용할 가능성을 제시하는 결과이다.

효모에서 Dna2와 상호작용할 것이라고 예측되는 단백질 중 (1), Lcd1은 checkpoint 단백질인 Mec1과 복합체를 이루며 손상된 DNA 부위에 결합하는 단백질이다(15). YHR122W는 기능이



**Fig. 6.** The effect of salt concentration on the YHR122W-Dna2 interaction. Microtiter wells coated with either YHR122W protein (●) or BSA (○) were incubated with 200  $\mu$ l of the fixed amount of Dna2 (10 nM, 1.7  $\mu$ g/ml) in the increasing concentration of NaCl (0-500 mM), and ELISA was performed as described in materials and methods. A405, absorbance at 405 nm. Consistent results were obtained from three independent experiments and a representative result was shown.

알려져 있지 않은 유전자로서 696 base pair (bp)로 이루어진 비교적 짧은 open reading frame (ORF)을 가지며 효모의 성장에 필수적인 유전자이다(16). 또한, 이 유전자는 모든 진핵 생물에서 발견되며 매우 높은 유사성을 보인다. 본 연구에서는 이 단백질의 기능을 연구하기 위한 방편으로 Dna2와의 상호작용을 확인하고자 하였다. YHR122W 유전자를 과량 발현시키면 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 온도감수성을 억제하는 유전학적 상호작용을 관찰하였으며, 정제된 단백질을 이용하여 ELISA로 두 단백질간의 직접적인 상호작용을 확인하였다. 이러한 결과는 YHR122W가 Dna2 효소활성에 영향을 주어 DNA 복제에 어떤 역할을 할 가능성을 제시한다.

본 연구에서는 진핵 생물의 DNA Okazaki fragment processing에서 RNA primer를 제거하는 역할을 하는 Dna2 단백질과 새로운 단백질인 YHR122W의 상호작용을 조사하였다. 그 결과, 단백질간의 *in vitro* 상호작용뿐 만아니라 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 표현형을 YHR122W 유전자가 억제하는 유전적 상호작용을 관찰함으로써, YHR122W의 생체내 기능이 Dna2의 기능과 연관성이 있을 것이라는 추론이 가능하였다. YHR122W 단백질이 Dna2 효소에 어떤 영향을 줄지는 앞으로 조사해야할 과제이다. YHR122W 단백질을 과량발현시켰을 때 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 표현형을 억제한다는 의미는 YHR122W의 양이 많아짐으로써 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이의 생체내 결합이 회복된다는 것을 뜻한다. 그런데 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이 효소는 야생형 Dna2와 *in vitro* 효소활성에 큰 차이가 없으나 trinucleotide repeat과 같은 특별한 염기서열에 의해서 ssDNA 부분에 이차구조가 생긴 기질에는 잘 작용하지 못하는 것이 발견되었다(unpublished data). 따라서 YHR122W는 dna2 $\Delta$ 405N 돌연변이 효소의 활성을 촉진함으로써 이러한 결합을 극복해줄 수도 할 가능성이 있다. YHR122W가 간접적으로 Dna2 돌연변이를 억제할 가능성도 배제할 수 없다. 예를 들어 Okazaki fragment processing에서 Dna2 다음으로 작용하는 Fen-1 효소의 활성을 촉진시키거나 Exo1과 같은 다른 보조적인 nuclease를 활성화시켜 Dna2 기능의 결합을 극복할 가능성도 있다. 이러한 가능성들을 조사하기 위해서는 이상에서 언급한 여러 가지 nuclease 들의 반응에 YHR122W 단백질을 첨가하여 반응의 변화를 관찰하는 실험이 진행되어야 할 것이다. YHR122W의 기능을 연구하기 위해서는 유전학적인 방법도 사용되어야 한다. YHR122W 유전자는 효모의 성장에 필수적인 유전자이기 때문에 온도감수성 돌연변이를 얻어 높은 온도에서 DNA 복제와 세포주기에 어떤 영향을 주는지를 조사하는 것은 이 유전자의 기능에 대한 실마리를 제공할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2003-041-C00223)

## 참고문헌

1. Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A.

- Bauer, J. Schultz, J.M. Rick, A.M. Michon, and C.M. Cruciat. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
2. Budd M.E. and J. Campbell. 1995. A yeast gene required for DNA replication encodes a protein with homology to DNA helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7642-7646.
  3. Budd, M.E., W.C. Choe, and J. Campbell. 1995. DNA2 encodes a DNA helicase essential for replication of eukaryotic chromosomes. *J. Biol. Chem.* 270, 26766-26769.
  4. Bae, S.H., E. Choi, K.H. Lee, J.S. Park, S.H. Lee, and Y.S. Seo. 1998. Dna2 of *Saccharomyces cerevisiae* possesses a single-stranded DNA-specific endonuclease activity that is able to act on double-stranded DNA in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.* 273, 26880-26980.
  5. Lee, K.H., D.W. Kim, S.H. Bae, J.A. Kim, G.H. Ryu, Y.N. Kwon, K.A. Kim, H.S. Koo, and Y.S. Seo. 2000. The endonuclease activity of the yeast Dna2 enzyme is essential in vivo. *Nucleic Acids Res.* 28, 2873-2881.
  6. Bae, S.H., J.A. Kim, E. Choi, K.H. Lee, H.Y. Kang, H.D. Kim, J.H. Kim, K.H. Bae, Y. Cho, C. Park, and Y.S. Seo. 2001. Tripartite structure of *Saccharomyces cerevisiae* Dna2 helicase/endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 29, 3069-3079.
  7. Bae, S.H. and Y.S. Seo. 2000. Characterization of the enzymatic properties of the yeast Dna2 helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* 275, 38022-38031.
  8. Bae, S.H., K.H. Bae, J.A. Kim, and Y.S. Seo. 2001. RPA governs endonuclease switching during eukaryotic Okazaki fragment processing. *Nature* 412, 456-461.
  9. Bae, S.H., D.W. Kim, J.Y. Kim, J.H. Kim, D.H. Kim, H.D. Kim, H.Y. Kang, and Y.S. Seo. 2002. Coupling of DNA helicase and endonuclease activities of yeast Dna2 facilitates Okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* 277, 26632-26641.
  10. Liu, Q, W. Choe, and J.L. Campbell. 2000. Identification of the *Xenopus laevis* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* DNA2 and its role in DNA replication. *J. Biol. Chem.* 275, 1615-1624.
  11. Kim, D.H., K.H. Lee, J.H. Kim, G.H. Ryu, S.H. Bae, B.C. Lee, K.Y. Moon, S.M. Byun, H.S. Koo, and Y.S. Seo. 2002. Enzymatic properties of the *Caenorhabditis elegans* Dna2 endonuclease/helicase and a species-specific interaction between RPA and Dna2. *Nucleic Acids Res.* 33, 1372-1383.
  12. Kang, H.Y., E. Choi, S.H. Bae, K.H. Lee, B.S. Gim, H.D. Kim, C. Park, S. MacNeill, and Y.S. Seo. 2000. Genetic analyses of *Schizosaccharomyces pombe* dna2<sup>+</sup> reveal that Dna2 plays an essential role in Okazaki fragment elongation and maturation. *Genetics* 155, 1055-1067.
  13. Imamura, Q. and J.L. Campbell. 2003. The human Bloom syndrome gene suppresses the DNA replication and repair defects of yeast dna2 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 8193-8198.
  14. Eki, T., K. Okumura, A. Shiratori, M. Abe, M. Nogami, H. Taguchi, T. Shibata, Y. Murakami, and F. Hanaoka. 1996. Assignment of the closest human homologue (DNA2L:KIAA0083) of the yeast Dna2 helicase gene to chromosome band 10q21.3-q22.1. *Genomics.* 37, 408-410.
  15. Zou, L. and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.
  16. Giaever, G., A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.

(Received December 19, 2005/Accepted February 18, 2006)

**ABSTRACT : Dna2 Helicase/endonuclease Interacts with a Novel Protein YHR122W Protein in *Saccharomyces cerevisiae***

Hyun-Sun Lee<sup>†</sup>, Do-Hee Choi<sup>†</sup>, Sung-Hoon Kwon, Na-Yeon Kim, In-Hwan Lee, Hyun-Jung Kim, Sung-Ho Bae\* (Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea)

*Saccharomyces cerevisiae* Dna2 helicase/endonuclease plays an essential role in removing RNA primers during Okazaki fragment processing in eukaryotic DNA replication. Genome-wide scale co-immunoprecipitation experiments predicted that Dna2 interacts with a novel protein YHR122W (1). In this study, we observed that overexpression of YHR122W gene suppressed the temperature-sensitive phenotype of dna2Δ405N mutation. To investigate direct interaction between these two proteins, a histidine-tagged recombinant YHR122W protein was expressed and purified from *E. coli*. Physical interaction between the purified YHR122W and Dna2 proteins was detected by enzyme-linked immunosorbent assays. Further more, the complex formation was most efficient at physiological salt concentration, 150 mM NaCl. The genetic and physical interactions between YHR122W and Dna2 shown in this study suggest that the biological functions of these two proteins may be closely related each other.