

단편을 삽입시킨 후 각종 제한효소로 cutting하여 동위원소로 labeling한 후, CRP와 반응시켜 free DNA와 bound CRP의 DNA band를 autoradiography로 확인한다.

lac: 5' AATTGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGACCC
malT: 5' AATTGTTGGAATTGTGACACAGTGCAAAATTCAGAGCCC
gal: 5' AATTGCGAAAAGTGTGACATGGAATAAATTAGTGACCC
ompA: 5' AAAACTTACAAGTGTGAACICCGTCAGGCATATGAAAC
crp: 5' AATGCACGGTAATGTGACGCCTTTGCATACATGCAGC
OR1: 5' TATTTTACTCTCTGGCGGTGATAATGGT

Fig. 2. The nt sequence of five different CRP-binding sites, as well as of *OR1*, the binding site of the bacteriophage λ CI or Cro proteins. When cloned into the *SalI* site, the 5' end of the sequences shown are closer to the *XbaI* site in pBend2.

여기서 free DNA fragment(164 bp)의 경우는 intrinsic bending은 볼 수 없고 CRP와 DNA가 복합체를 형성한 fragment의 이동도는 free DNA의 이동도보다 느리며, CRP binding site가 fragment의 양끝 부분에 위치할 경우는 가장 높은 이동도를 보였고, 중앙 부분에 binding site가 있는 경우는 가장 낮은 이동도를 보였다(그림 3).⁷⁾

그리고 *lac*, *malT*, *gal* 그리고 *crp*의 경우처럼 CRP binding site의 공통 염기 배열이 다른 경우 CRP · DNA complex의 전기영동에서 알 수 있듯이 CRP · DNA complex는 promoter 영역의 CRP binding site 위치에 따라 일치하지 않음을 알 수 있으며 *lac* promoter에서와 마찬가지로 binding site가 중앙에 있을 때 가장 적게 이동했으며, 양끝 부분에 binding site가 있을 경우는 가장 많이 이동했다. 이와 같은 결과는 *ompA* promoter에서도 binding site에 따른 유사한 결과가 보고되어 있다.

3. cAMP CRP에 의한 DNA bending pattern

과연 같은 위치에 CRP binding site가 위치할 경우 다른 유전자에서는 어떠한 bending 양상을 나타낼까? *lac*과 *malT*의 promoter 영역의 DNA fragment를 이용하여 co-electrophoresis의 실험으로 확인한 결과, CRP binding site의 nucleotide sequence의 상이에 따라서는 다른 ben-

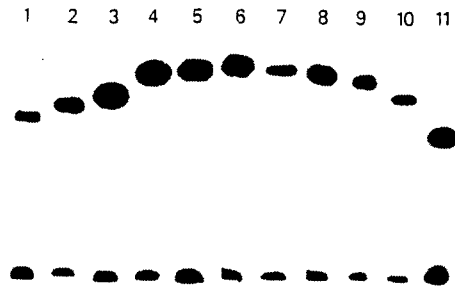


Fig. 3. Gel electrophoresis of permuted fragments of *lac* CRP sites. CRP was mixed separately with eleven different 5' -end³²P-labeled DNA fragments. In a volume of 20 μ l, a sample of each labeled fragment was mixed with 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 50mM KCl, 20 μ M cAMP, 50 μ g/ml BSA, 10% glycerol, and 1nM CRP. PA gel concentration was 10%. Binding was done under which 50% of the DNA formed complexes with CRP. The DNA fragments used were generated by restriction enzymes which, from left to right, are *Mlu* I, *Bgl* II, *Nhe* I, *Spe* I, *Xho* I, *Eco*RV, *Pvu* II, *Stu* I, *Nru* I, *Kpn* I and *Bam*HI. The fragments at the bottom of the gel are free DNA, and those at the upper part are bound to cAMP · CRP complex.

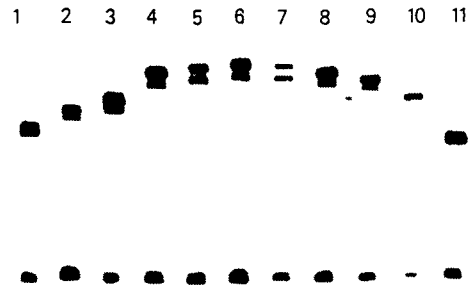


Fig. 4. Co-electrophoresis of the CRP complexed with the ³²P-labeled *lac* and *malT* CRP-binding sites. Eleven of the 17 fragments described in Figs. 1 and 3 were used. The more retarded of the doublet bands are the *lac* DNA complexed with CRP. Conditions are the same as in Fig. 3.

ding 양상을 보여주었다(그림 4). 그리고 다양한 결합 부위에 따른 이동 pattern의 차이를 그림 5에서 볼 수 있다.⁸⁾

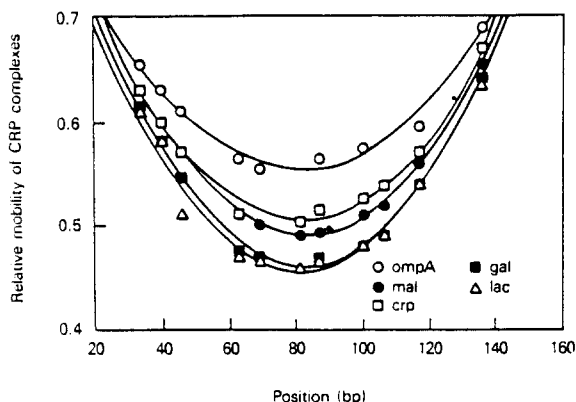


Fig. 5. The relative mobility of CRP · DNA complexes were plotted against the location of the CRP · binding sites within the 164-bp fragments. Symbols : Δ , CRP · *lac* DNA complex ; \bullet , CRP · *malT* DNA complex ; \blacksquare , CRP · *gal* DNA complex ; \circ , CRP · *ompA* DNA complex ; \square , CRP · *crp* DNA complex.

즉 CRP binding site의 공통 염기 배열의 차이가 bending의 pattern을 달리함을 알 수 있다. 이러한 전기영동의 실험적 방법에 의해 계산된 CRP에 의한 bending각은 큰 차이가 있음을 알 수 있다.(표 1)

lac CRP bending 각은 $90^{\circ}\sim 180^{\circ}$ 라고 발표했다.⁶⁾ CRP 및 CRP의 조절하에 있는 수종의 promoter에 의한 bending은 CRP binding site의 상동성은 약간 차이가 있으나 CRP binding site의 위치가 비슷한 조건에서는 $70^{\circ}\sim 96^{\circ}$ 의 각을 가지면서 큰 차이를 볼 수 없었고, *ompA*<*crp*<*malT*<*gal*<*lac*의 순으로 큰 각을 갖는다고 했다.⁷⁾

4. 다른 조절 단백질에 의한 DNA bending

CRP는 negative 혹은 positive하게 발현 조절을 한다. Bending에 의해서 *lac*, *galP1*, *malT* 같은 유전자는 positive한 control을 받고 *galP2*, *crp*, *ompA*의 promoter는 ne-

Table 1. Comparison of DNA-bending induced by regulatory proteins.

Protein	DNA-binding site	Relative electrophoretic mobility μ_M/μ_E^a	Apparent bending angle, α^b
CRP	<i>lac</i> promoter	0.667	96°
CRP	<i>malT</i> promoter	0.718	88°
CRP	<i>gal</i> promoter	0.682	94°
CRP	<i>crp</i> promoter	0.743	84°
CRP	<i>ompA</i> promoter	0.820	70°
CI	<i>o_R1</i> operator	0.920	46°
Cro	<i>o_R1</i> operator	0.965	30°
LacI	<i>lac</i> operator	0.859	62°
GalR	<i>O_I</i> operator	0.558	112°
GalR	<i>O_E</i> operator	0.659	97°

^a The relative electrophoretic mobilities of DNA protein complexes for CRP (in 10% PA gel), CI and Cro (in 8% PA gel) were determined from the experiments of Figs. 3-5 and for LacI (in 4% PA gel) and GalR (in 8% PA gel) from Zwieb et al. (1989).

^b The apparent bending angles were calculated from the electrophoretic mobilities as described by Thompson and Landy (1988).

gative하게 control된다.

CRP가 아닌 다른 조절단백질 중 Gal과 Lac repressor는 DNA bending에 의해 negative하게 조절되는 것으로 보고 되어 있다.⁸⁾ CI protein은 P_L 과 P_R promoter를 negative하게 control하며, P_{RM} promoter는 positive하게 조절하는 것을 phage에서 확인했다.⁹⁾ Cro protein의 경우는 P_L 과 P_R 를 negative하게 control한다.⁹⁾

5. 전사 촉진과 DNA bending

CRP는 *lac*, *galP1* 그리고 *mal* gene의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있다. CI protein도 λ operator 염기 배열을 전사촉진하는 것으로 같은 종류 P_{RM} promoter에서 확인되었다.¹¹⁾

Jin, K. et al. (1989)의 보고에 의하면 *lac*>*gal*>*malT* 순으로 bending 각이 크다. 이것은 CRP에 의한 bending 정도를 나타내는데 이는 안정한 결합을 하기 위하여 bending이 일어난 것으로 설명하고 있다. Wu and Crothers

(1984)는 전사 촉진의 중요한 인자 CRP에 의한 bending이라고 밝혔다. RNA polymerase에 의한 전사개시를 위해 protein과 DNA 혹은 protein과 protein과의 접촉을 용이하게 하기위해 bending이 유발됨으로서 전사가 촉진되어지는 것으로 설명하고 있다. 이들 기작을 밝히기 위한 연구로는 RNA polymerase가 promoter에 결합함으로써 RNA polymerase 복합체가 전사 개시를 촉진하거나 실제의 promoter site부터 upstream에 위치한 site 사이에 이 복합체가 직접 접촉하여 전사가 촉진된다는 연구가 보고되어져 있다.¹⁰⁾ 바꿔 말하면 CRP binding에 의한 bending은 RNA polymerase와 upstream site와의 접촉을 용이하게 하기 위함이며, 전사개시를 촉진하기 위해 필요한 것은 positive acting 조절 단백질과 RNA polymerase와의 직접적인 접촉으로 설명한다. 이는 CRP나 CI에 의한 DNA bending에서 RNA polymerase와 조절단백질은 접촉을 용이하게 하기 위하여 적절한 기하학적인 형태를 갖는다는 보고에서 뒷받침되고 있다.^{12,13)}

한편 bending을 유도하지 않으면서 DNA와의 안정한 복합물을 형성하는 것으로 밝혀진 CRP mutant의 특성은 많은 가능성을 암시하고 있다.

최근 필자 등은 CRP mutant의 하나인 *crp*1*을 이용하여, maltose 대사를 촉진하는 유전자를 cloning하여 이 유전자의 promoter 영역에 CRP binding site의 consensus sequence가 존재함을 gel shift assay 통해 확인했다.(data not shown). 이 promoter를 primer extension 실험으로 전사개시점을 확인한 결과 P1, P2의 두 전사개시점이 있었고 이들은 서로 CRP*1 protein에 의해 각기 다르게 조절받는 것으로 확인했다 (data not shown). 또 bending vector에 CRP binding 영역을 포함하는 promoter를 cloning시켜 다양한 위치의 CRP binding site가 위치하도록 몇종의 제한효소로 절단하여 bending 실험을 한 결과 bending이 일어남을 확인했다. 그 경향도 *lac*, *maltT* 등의 결과와 일치함을 확인했다.(그림 6)

6. Negative regulation과 DNA bending

Negative 조절 단백질은 주로 입체적인 방해에 의해 전사개시가 저해되는 것으로 설명하고 있다. 같은 종류나 overlapping promoter에 RNA polymerase의 접근을 방해

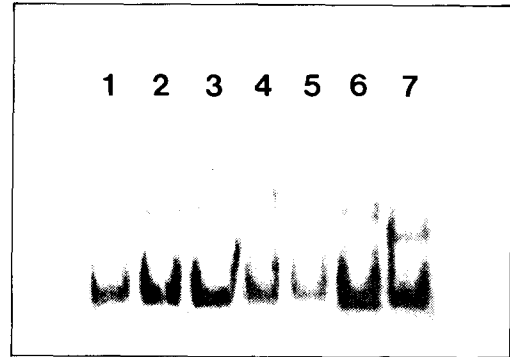


Fig. 6. Gel electrophoresis of permuted fragment of *sfs4* CRP site, CRP was mixed separately with several different 5' -end ³²p-labeled DNA fragments. In a volume of 20μl, a sample of each labeled fragment was mixed with 20mM Tris pH7.5, 40 mM NaCl, 10mM MgCl₂, 40mM KCl, 1mM DTT, 1mM cAMP, 2mM EDTA, 0.1mg/ml BSA, 0.5μg/μl poly (dI-dC) and 2.3ng CRP*1 protein. Polyacrylamide gel concentration was 5%. The DNA fragments used were generated by restriction enzymes which, from left to right, are *Mlu* I, *Nhe* I, *Xho* I, *Pvu* II, *Stu* I, *Ssp* I and *Bam* H I. The fragments at the bottom of the gel are free DNA, and those at the upper part are bound to cAMP-CRP complex.

하는 것으로 조절단백질이 DNA에 결합함으로써 가능하다. 하여튼 negative 조절 단백질의 binding site는 종종 RNA polymerase binding site부터 말단이나 여러 부위에 나누어져 있으며, 고차구조의 negative regulatory protein · RNA polymerase · DNA 복합체의 형성에서 RNA polymerase는 inactive 상태가 유지되고 있음을 보고했다.^{15,16)} 조절단백질에 의한 DNA bending은 protein-protein 혹은 DNA-protein 접촉에 의한 복합체의 형성에 도움이 된다.

한편 positive control protein 혹은 RNA polymerase에 의한 DNA bending은 전사 촉진을 위하여 요구되며, 그러나 negative control protein은 전사 반대 방향 끝의 bending으로 DNA를 조정하는 것으로 설명하고 있다. 8개의 negative한 조절단백질과 DNA complex (CRP · *galP2*,

CRP · *ompA*, CRP · *crp*, GalR · OE, GalR · OI, LacI · O, CI · *O_{R1}* 그리고 Cro · *o_{R1}*)에서 negative 조절단백질에 의해서 DNA bending이 유도되었다. 이러한 bending은 protein DNA complex의 안정을 위해 요구되는 본래의 성질로 설명한다. 이러한 측면에서 non bending protein mutant의 분석이 필요하다. 한편, negative auto regulation *crp* promoter의 경우는 특이하게 upstream 부근의 divergent promoter로 부터 CRP에 의해 간접적인 positive control로 설명하고 있다.¹⁷⁾ 즉 divergent(antisense) RNA는 *crp* promoter로 부터 생성되며, 이 divergent RNA는 *crp* 전사 저해를 위해 *crp* mRNA의 5'-말단에 상호작용 하는 것으로 보고하고 있다. CRP site의 결합에 의한 bending은 negative하게 control하나, divergent promoter의 positive control 작용으로 인한 간접적인 작용으로 설명한다.

참 고 문 헌

- Garges, S. and Adhya, S., How the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* Works, University of Texas press, Ausin, 45-56(1987).
- Ullmann, A. and Danchin, A., Adv. Cycl. Nucl. Res., **15**, 1-53(1983).
- Aiba, M., and Krakow, J. S., Biochemistry, **20**, 4774-4780(1981).
- Weber, I. T. and steitz, T. A., J. Mol. Biol., **198**, 311-326(1987).
- Wu, H. -M. and Crothers, D. M., Nature, **308**, 509-513(1984).
- Liu-Johnson, H. -N., Gartenberg, M. R. and Crothers, D. M., Cell, **47**, 995-1005(1986).
- Kim, J., Zwieb, C., Wu, C., and Adhya, S., Gene, **85**, 15-23(1989).
- Zwieb, C., Kim, J. and Adhya, S., Gene Develop., **3**, 606-611(1989).
- Koepsel, R. R., and Khan, S. A., Science, **233**, 1316-1318(1986).
- Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A. D, Mauen, R., Meyer, B. J., Pabo, C. O., Roberts, T. M. and Sauer, R. T., Cell, **19**, 1-11(1986).
- Plaskon, R. R. and Wartell, R. W., Nucleic Acids Res., **15**, 785-796(1987).
- Guarente, L., Nye, J. S., Hochschild, A. and ptashne, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2236-2239(1982).
- Irwin, N. and Ptashne, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 8315-8319(1987).
- Adhya, S.44, Annu. Rev. Genet., **23**, 209-320(1989).
- Haber, R. and Adhya, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 9683-9687(1988).
- Okanto, K. and Freundlich, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 5000-5004(1986).
- Thompson, J. F. and Landy, A., Nucleic Acids Res., **20**, 9687-9705(1988).