

돌연변이 T7 RNA 중합효소의 머리핀 구조가 만들어지지 않는 인자독립형 전사종결 부위에서의 전사종결에 관한 연구

신지영, 김동희, 이상수
배재대학교 생명공학과, 바이오의약연구센터

Termination of mutant T7 RNA polymerases on intrinsic hairpin-independent termination signals

Ji Young Shin, Sang Soo Lee
Department of Life Science and Technology

T7 RNA 중합효소는 두 종류의 인자 독립형 전사 종결신호를 인지하여 전사연장을 종결하게 되는데 이 중 머리핀 구조가 만들어지지 않는 PTH와 CJ 전사종결 부위는 'ATCTGTT' non-template 염기서열 다음에 T염기가 많은 부분이 존재하는 형태로 이루어져 있다. 이와 같은 전사종결을 민감하게 인지하는 돌연변이 T7 RNA 중합효소인 X4, X19, BG8과 이와 반대로 둔감하게 인지하는 R173C를 제조하여 전사활성도를 측정하였다. 이 결과 야생형 T7 RNA 중합효소에 비해 X4는 8%, X19는 33%, BG8은 34%의 전사활성도를 보여 전사활성도가 상당히 감소하는 결과를 보였다. 반면에 R173C는 야생형에 비해 112%의 전사활성도를 보여 야생형과 거의 유사한 전사활성도를 보였다. 또한 PTH 및 CJ 전사종결 부위를 전사주형으로 이용하여 전사하였을 때 X4, X19, BG8은 야생형 RNA중합효소에 비해 종결 부위에서의 종결이 증가하였으나 R173C는 거의 PTH 및 CJ 전사종결부위에서 전사종결이 일어나지 않고 전사가 진행되는 것을 확인하였다.

T7 RNA polymerase also recognize intrinsic, hairpin-independent termination signal, a conserved 7-base pair sequence (ATCTGTT in the non-template strand) and U-rich sequence downstream of it. These intrinsic, hairpin-independent termination signals were commonly found in PTH and CJ termination sequences. There are two types of mutant T7 RNA polymerases recognizing sensitively

(X4, X19, BG8) or insensitively (R173C) the intrinsic termination signals. We determined the T7 transcription activities of these mutants. Compared to wild-type, mutants X4, 19 and BG8 show highly reduced transcription activities (8%, 33%, 34%). On the other hand mutant R173C shows comparable transcription activity of wild-type (112%). Also transcription termination efficiencies at the PTH or CJ termination signals were determined by using mutant RNA polymerases. Termination of mutants X4, X19 and BG8 are increased compared to wild-type. On the other hand mutant R173C proceeds through PTH and CJ termination signals.

I. 서 론

T7 RNA 중합효소는 보조인자 없이 전사를 진행하는 하나의 subunit로 구성된 RNA 중합효소이다. T7 RNA 중합효소와 multi-subunit RNA 중합효소를 비교해 볼 때 염기 서열이나 구조적으로 상동성이 적음에도 불구하고 전사 진행에 있어서 기초적인 특성은 두 그룹 사이에 매우 유사하다 (Master, 1987).

전사 진행은 전사개시, 전사연장, 전사종결의 3단계로 나누어진다. 전사개시단계는 전사촉진제 DNA를 RNA 중합효소가 특이적으로 인지하여 RNA 중합효소와 DNA의 결합, 주형의 melting, 초기전사복합체의 형성 그리고 연장상태로의 전이 등의 여러 부분으로 진행된다. 전사개시는 전사촉진제 DNA로부터 분리된 전사복합체를 안정화하기 위한 충분한 길이를 가지는 nascent 전사체가 생성하여 전사촉진제 DNA에서 RNA 중합효소가 벗어나면서 전사연장 단계로 진행된다. 마지막으로 전사종결단계가 존재하는데, 전사종결 부위에서 RNA중합효소와 DNA 그리고 RNA의 복합체가 분리되고, 전사과정이 끝난다 (Chamberlin, 1992; Crok *et al.*, 1992). 대장균의 전사에서 전사종결단계는 크게 2가지 종류의 전사종결이 존재하는데 여기에서는 Rho-factor라는 전사종결인자가 관여하는가 아니면 관여하지 않는가에 따라서 구분한다 (von-Hippel and Yagar, 1992). 먼저 Rho-factor가 관여하는 전사종결은 Rho-factor 의존적 전사종결 이라고 한다. Rho-factor는 전사연장과정에서 DNA-RNA-protein 복합체에서 nascent RNA 부분에 Rho-factor가 인지하는 부분이 존재하여 Rho-factor가 그곳에 결합한다. 그리고 빠른 속도로 DNA-RNA-protein 복합체 방향으로 이동한다. 그 후 Rho-factor는 ATP 에너지를 사용하여 DNA-RNA-protein 복합체의 결합을 끊어버린다. 그리하여 전사과정이 모두 종결된다. 다음은 Rho-factor 비 의존적 전사종결 과정을 생각해 보면 전사종결 무렵 RNA의 분자들은 매우 안정된 stem loop를 형성하고, 이

때 아직까지 DNA와 결합되어 있던 RNA 분자들 부분은 약한 결합력을 가진 poly U가 형성되는데, 이 U들은 일반적으로 G나 C보다는 결합력이 약하므로 loop의 3차원 구조와 U-rich에서의 약한 결합으로 인해 전사과정이 종결된다. 그리하여 전사과정이 모두 종결된다 (Dunn and Studier, 1983).

T7 RNA 중합효소는 intrinsic termination signal의 2가지 type을 인지한다. hairpin-dependent termination과 independent termination이 그것이다 (그림 1). T7 genome의 late region에 위치한 T Φ 는 hairpin-dependent termination signal type의 대표적인 예이다. RNA hairpin 구조의 이 signal은 U-rich stretch가 뒷부분에 존재한다. 두 번째 type의 hairpin-independent termination signal은 클로닝된 human prepro-parathyroid hormone (PTH) 유전자에서 처음으로 밝혀졌는데 nascent RNA는 secondary structure를 형성하지 않으며 down stream의 U-rich stretch는 termination efficiency에 중요하다 (Hartvig and Christiansen, 1996; Kwon and Kang, 1999). 이 type의 경우는 replicating T7 DNA의 concatemer junction, *E. coli* *rrnB* T1 terminator, vesicular stomatitis virus(vsv), adenovirus DNA 그리고 bacteriophage lamda DNA에 존재하며, 공통적으로 ATCTGTT의 염기서열이 존재한다. 이 signal은 pausing 혹은 termination의 원인이 될 수 있다고 보고 되었다. Conserve된 upstream module 보다 T-rich downstream signal이 전사체가 전사복합체에서 분리되어 이탈하는 것을 효과적으로 도와준다 (Hartvig and Christiansen, 1996; Kwon and Kang, 1999; Lyakhov *et al.*, 1998).

최근에는 elongating transcript와 T7 RNA 중합효소가 상호 작용하는 specificity loop가 밝혀졌다. 이 specificity loop는 transcription에서 두 가지 역할을 가진다. 첫 번째는 promoter에 binding하는 것이고, 두 번째는 RNA product와 subsequently interaction하는 것이다 (Temiaikov *et al.*, 2000; Shen and Kang, 2001).

아미노산의 173번째와 465번째, 702번째와 821번째를 돌연변이 시킨 RNA 중합효소들은 특이적으로 종결효율을 증가시킨다고 보고 되어 있는 lysozyme의 민감도를 증가시키거나 혹은 감소시키는 역할을 한다. R173C 돌연변이는 termination-defective 표현형으로써, mature 파아지 DNA의 CJ 전사종결부위에서 전사종결을 저해하는 돌연변이체이고, X19 (A465T)와 BG8-4630 (A702T) 돌연변이체들은 lysozyme 없이도 CJ 신호의 인지를 증가시키는 돌연변이로 보고 되었다 (Lyakhov *et al.*, 1997; Zhang and Studier, 1995).

이러한 사실을 바탕으로 본 실험실에는 T7 중합효소와 염기서열 특이적 전사종결부위인 PTH 및 CJ 전사종결 부위에서 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사종결의 효율과 전사활성도를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

플라스미드 strain에 대한 host로써 *E. coli* XL-1 Blue가 사용되었고, 재조합 T7 RNA 중합효소와 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 발현은 *E. coli* BL21가 사용되었다. T7 RNA 중합 효소에 대한 T7 파아지의 유전자 1이 클로닝 된 플라스미드 pAR1219와 돌연변이 T7 RNA 중합효소 (X4, X19, BG8)가 클로닝 된 플라스미드들은 F. W. Studier (Brook National Lab) 으로부터 받았다. 또한 R173C는 본 연구실에서 클로닝한 것을 사용하였다. (Kim, 2001) 전사연장복합체를 만들기 위한 플라스미드 pUWH와 pUPTH는 강창원 박사로부터 (한국과학기술원 생명과학과) 받았고, pUPTH로부터 pUCJ를 다시 클로닝 하였다.

CJ 종결부위 클로닝

CJ종결부위는 자동 DNA 합성기로 phosphoroamidate 방법에 의해 2가지의 Deoxyoligonucleotides를 합성하였다. 합성된 DNA는 아래와 같다.

top

5'-CTAGAGTCCCTATCTGTTACAGTCTCCTA-3'

bottom

5'-AGCTTAGGAGACTGTAACAGATAGGGACT-3'

DNA 합성기에 의해 만들어진 두개의 Deoxyoligonucleotides는 1:1로 섞은 후 annealing하여, PTH종결부위가 클로닝 되어있는 pUPTH를 *Xba* I과 *Hind* III로 잘라낸 부위에 재조합 하였다.

돌연변이 T7 RNA 중합 효소의 발현 및 정제

T7 RNA 중합효소 정제는 *E. coli* BL21로 transformation하여 LB ampicillin broth에서 OD₆₀₀이 0.1-0.2까지 키운 다음 IPTG를 최종농도 0.1-0.2 mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 진탕 배양하여 전사 촉진제를 induction 시킨다. *E. coli*를 원심 분리하여 세포를 모은 후 Harvest buffer와 0.2 mM mercaptoethanol에 최초부피의 20분의 1부피로 녹여 1.5 ml tube에 1 ml씩 나누어 담고 다시 harvest하여 -70℃에 보관하였다. -70℃에 보관

된 세포는 A-100 buffer 500 μ l와 0.1 M PMSF 10 μ l를 넣고 sonicator로 세포를 분쇄하여 원심분리한 후 상층액만 회수하여 resin volume 10배의 A-100 buffer로 pre-equilibrium한 phospho-cellulose column에 binding하였고, 다시 6배의 A-100 buffer로 column을 세척한 후 2배의 A-400 buffer로 elution하고 다시 4배의 A-600 buffer로 column을 씻었다. 각 fraction을 SDS-PAGE에 걸어서 확인하고 50% glycerol과 섞어서 보관하였다.

T7 RNA 중합효소의 활성 측정

T7 RNA 중합효소의 활성 측정을 위해 run-off 전사 활성도를 측정하였다. 반응 조건은 20 μ l의 부피로 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM NTPs 2 mM spermidine, RNasin 0.2 unit [α -³²p] UTP (30 μ Ci/ μ mol)와 적절한 제한효소로 절단된 주형 플라스미드 1 μ g에다 T7 RNA 중합효소 10 unit을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응한 후 동량의 stop solution (10 mM EDTA, 97.5% formamide, 0.05% Bpb, 0.05% XC)을 첨가하여 2분간 72°C에서 열을 가한 후에 8 M urea 6% polyacrylamide denaturation gel에 20 μ l씩 loading한 후 전기영동하여 분리하였다. Run-off 전사 band의 방사성 동위원소는 Fugi phosphoimage analyzer Bas-1800을 이용하여 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

CJ 종결부위의 클로닝

CJ종결부위는 replicating T7 DNA의 concatemer junction에서 발견된 hairpin-independent termination signal로써 ATCTGTT의 염기서열이 존재한다. 이러한 사실을 기초로 본 실험실에서는 CJ 종결부위를 클로닝하기 위하여 CJ 종결부위의 염기서열 양쪽 끝에 *Hind* III와 *Xba* I의 제한효소 자리를 가지는 29 bp의 DNA adaptor를 제작하였고 (재료 및 방법 참조), 이 두 adaptor를 서로 annealing하여, pUC벡터에 PTH종결부위가 클로닝 되어 있는 pUPTH를 *Hind* III와 *Xba* I로 잘라서 PTH종결부위를 잘라낸 후 이 자리에 삽입하여 클로닝하였고, 이것을 제한효소 *Bam*H I으로 잘라지는 것만 선별하여 DNA sequencing을 하여 클로닝 된 것을 확인하였으며, pUCJ라 명명하였다.

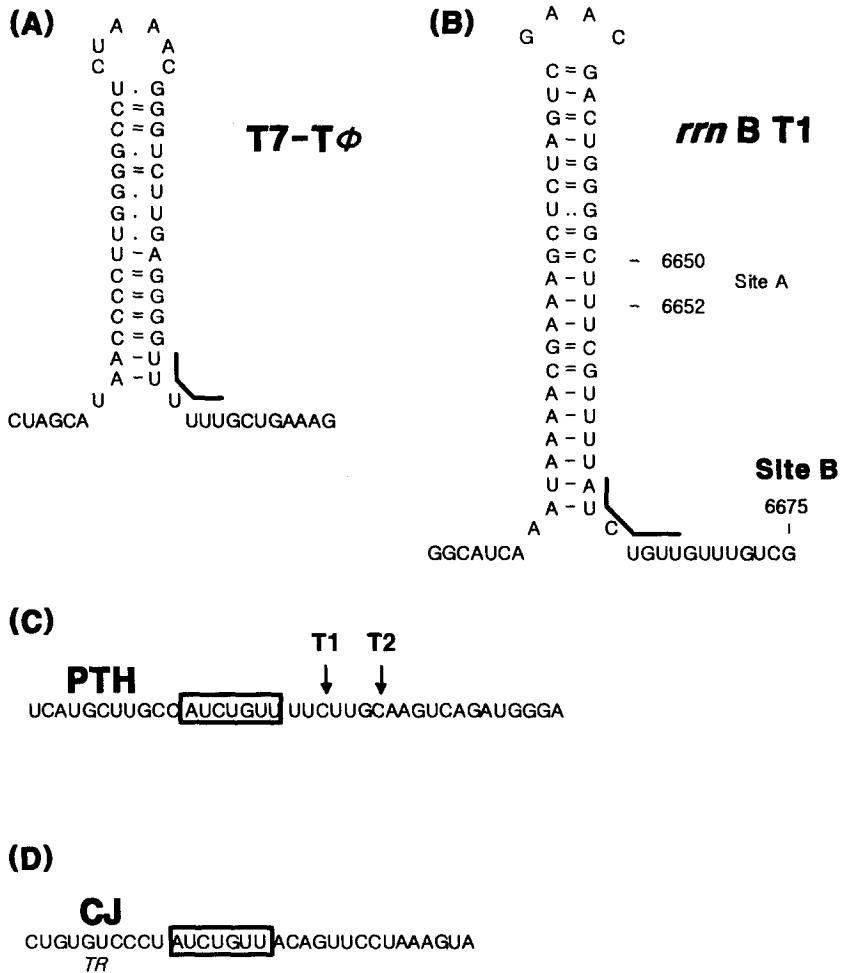


그림 1. 전사종결 signal. (A) T7 genome의 late region에 위치한 T ϕ 전사종결 signal, (B) E.coli rmB T1 전사종결 signal, (C) Human prepro- parathyroid hormone (PTH) 유전자에 위치한 전사종결 signal, (D) T7 파아지 DNA의 concatemer junction에 있는 전사종결 signal.

야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소 발현과 정제

야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 발현에는 *E. coli* BL21을 사용하였다. 발현 플라스미드가 삽입된 *E. coli* BL21을 LB액체배지에서 접종하여 IPTG로 유도하여 발현시켰고, 세포 추출물을 10% SDS-PAGE에 의하여 분석하였다. 세포 추출물의

SDS-PAGE 는 IPTG에 의해 유도된 것과 유도되지 않은 것으로 구분하였다. IPTG에 또한 초음파 분쇄를 이용하여 세포 추출액과 세포찌꺼기로 구분하였고, 대부분 유도된 단백질들은 세포 추출액에서 나타났다. 다시 이 세포 추출액을 phospho-cellulose column chromatography에 통과시켜 A-400 buffer의 상태에서 정제를 통해 SDS-PAGE gel 상에서 단일 band를 확인할 수 있었다 (data not shown).

야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사활성도 측정

야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사 활성도를 측정하기 위하여, *in vitro* 전사 활성도를 측정하였다. 이를 위해서 T7 전사 촉진제가 삽입된 플라스미드 DNA를 제한효소 *Pvu* II 처리를 하였고, 각각의 야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사 활성도를 측정하였다 (그림 2).

일반적으로 야생형의 T7 RNA 중합효소는 phage 전사 기작에서 전사가 일어날 때, T7 lysozyme이 T7 RNA 중합효소의 N-terminal domain과 palm 사이에 결합을 하여 RNA 중합효소의 전사 활성을 억제한다는 것이 최근 보고 되었다 (McAllister *et al.*, 1981; Moffatt and Studier, 1987; David and Thomas, 1998). 그리고 이러한 lysozyme의 작용기작 부위에 point mutation 시킨 부분의 중합효소는 각각 lysozyme의 sensitivity를 증가시키거나 감소시키는 돌연변이들로 최근 많이 보고 되었다. 이러한 돌연변이들은 각각 mutant X4나 mutant X19 그리고, mutant BG8-4630이며, 이들은 821번 위치의 아미노산을 alanine을 threonine으로, 421번 위치의 아미노산을 alanine을 threonine으로, 그리고, 702번 위치의 아미노산을 alanine을 threonine으로 돌연변이가 일어났으며, 이들은 lysozyme에 대한 민감도를 증가시키거나 전사 종결의 효율을 높이는 것으로 보고 되어있다(Lyakhov *et al.*, 1997). 또한 173번 위치의 arginine을 cysteine으로 돌연변이 시킨 것은 sequence 특이적 전사 종결의 효율을 떨어뜨리는 것으로 최근 많이 보고 되었다. 각각의 T7 RNA 중합효소의 야생형 및 돌연변이의 전사 활성도를 비교해 본 결과 각각의 돌연변이의 활성도가 야생형에 비해 낮은 것으로 나타났다. 특히 X4가 가장 낮았고 (8%), X19와 BG8은 비슷한 활성도를 보였다 (33%, 34%). 그러나 R173C는 다른 돌연변이와는 달리 활성도에는 야생형과 차이가 없었고 오히려 야생형보다 12%정도 더 높게 나왔다 (그림 2).

그림 2. 야생형 및 돌연변이 T7 RNA중합효소의 *in vitro* 전사활성도 측정. T7 전사 촉진제가 삽입된 플라스미드 DNA를 제한효소 Pvu II 처리하여 전사 주형으로 사용하였다.

야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사종결효율성 측정

PTH 종결부위는 전사 종결에서 Rho-factor independent termination의 loop의 구조 중 U-rich 부분의 sequence 부근의 'ATCTGTT'의 특이적인 sequence 부분에 전사물이 종결되는 것이 최근 보고 되었다.

PTH 전사종결부위에서 야생형 및 돌연변이 T7 RNA중합효소들의 전사종결효율성을 측정하기 위해서 T7 전사 촉진제와 PTH 전사종결부위가 삽입된 pUPTH 플라스미드 DNA를 제한효소 *Hind* III 처리를 하여 *in vitro* transcription하였다. PTH전사종결부위에서는 특이하게도 전사종결부위의 밴드가 두 개로 나타났는데 이것은 전사종결이 한번

에 되지 않고 전사종결 sequence를 지나면서 한번 종결되고 5bp 지나서 다시 전사 종결되는 것을 보여준다. (그림 3) *In vitro* transcription의 결과로 야생형 T7 RNA 중합효소는 절반이상 전사 종결되는 것으로 나타났고 (64%), X4, X19, BG8 돌연변이 T7 RNA중합효소들은 야생형에 비해 전사 종결이 각각 74%, 89%, 83%로 증가되는 것으로 나타났다. 반면 R173C 돌연변이는 거의 전사종결이 일어나지 않고 계속해서 전사 진행하는 것으로 나타났다 (8%).

CJ 전사종결부위에서 야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소들의 전사종결효율성을 측정하기 위해서 T7 전사 촉진제와 CJ 전사종결부위가 삽입된 pUCJ 플라스미드 DNA를 제한효소 *Hind* III 처리를 하여 *in vitro* transcription하였다. 야생형 T7 RNA 중합효소는 20% 전사종결이 일어난 반면, X4, X19, BG8-4630 돌연변이 T7 RNA중합효소들은 각각 66%, 64%, 62%로 절반이상 전사종결이 되는 것으로 나타났다. R173C T7 RNA중합효소는 거의 전사종결이 되지 않고 (2%) 계속해서 전사 진행하는 것으로 나타났다. (그림 4)

이와 같은 연구 결과에서 야생형 T7 RNA 중합효소는 CJ 전사종결 부위의 전사종결보다 (20%) PTH 전사종결 부위에서의 전사종결이 잘 일어났으며 (64%), 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 경우도 같은 결과를 보였다. 이는 CJ 전사종결 부위의 conserve된 부분의 3'부분에 T가 많이 연속적으로 존재하지 않아 정지한 전사물이 쉽게 떨어지지 않고 있다가 전사연장 단계로 진행되는 것으로 해석된다. X4, X19, BG8-4630은 모두 PTH 및 CJ 전사종결 부위에 민감하게 작용하는 돌연변이 T7 RNA중합효소로 야생형에 비해 PTH 전사종결부위에서 약 10-20% 전사종결이 증가했으며, CJ 전사종결부위에서는 약 40% 전사종결이 증가하였다. 반면 R173C는 이들 전사종결 부위에 둔감하여 거의 전사종결이 일어나지 않았음을 확인하였다.

그림 3. PTH 전사종결 부위에서의 야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 전사종결 효율 측정. R: 전사 연장된 Run-off RNA 생성물 T: 전사 종결된 RNA 생성물. PTH 전사종결 부위가 삽입된 pUPTH를 HindIII로 잘라 전사 주형으로 사용하였다.

그림 4. CJ 전사종결 부위에서의 야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 전사종결 효율 측정. R: 전사 연장된 Run-off RNA 생성물 T: 전사 종결된 RNA 생성물. CJ 전사종결 부위가 삽입된 pUCJ를 HindIII로 잘라 전사 주형으로 사용하였다.

IV. 감사의 글

이 논문은 한국과학재단 지정 배재대학교 바이오의약연구센터의 지원에 의해 수행되었습니다.

IV 참고문헌

- Chamberlin, M. J. (1992) New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. *Harney Lect.* **88**, 1-21.
- Crok, D. N., Ma, D., Pon, N. G. and Hearst J. E. (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10603-10607.
- David, J. and Thomas A. S. (1998) Structure of T7 RNA polymerase complexed to the transcriptional inhibitor T7 lysozyme *EMBO J.* **17**, 4101-4113
- Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* **166**, 477-535
- Kim, D. H. (2001) Establishment of transcription elongation complex and sequence-specific transcription termination by T7 bacteriophage RNA polymerase. Master Degree Thesis, Pai Chai university, Taejon, Korea.
- Master, B. S., Stohl, L. L. and Clayton, D. A. (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, **51**, 89-99.
- McAllister, W. T. Morris, C., Rosenberg, A. H. and Studier, F. W. (1981) Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *J. Mol. Biol.*, **153**, 527-544
- Moffatt, B. A. and Studier, F. W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, **49**, 221-227.
- Shen H, Kang C. (2001) Two site contact of elongating transcripts to phage T7 RNA polymerase at C-terminal regions. *J Biol Chem.* **276**, 4080-4084
- Temniakov, D., Montesana, P. E., Ma, K., Mustaev, A. Borukhov, S., and McAllister, W. T. (2000) The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the

promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14109-14114

von-Hippel, P. H., and T. D. Yager (1992) The elongation-termination decision in transcription. *Science* **255**, 809-812

Zhang X. and F. W. Studier. (1995) Isolation of transcriptionally active mutants of T7 RNA polymerase that do not support phage growth. *J. Mol. Biol.* **250**, 156-163.