

염기서열 특이적 전사종결에 영향을 주는 T7 파아지 lysozyme의 역할

김동희, 이상수

배재대학교 생명공학과, 바이오의약연구센터

Role of T7 phage lysozyme affected sequence-specific transcription termination by T7 RNA polymerase

Dong Hee Kim and Sang Soo Lee

Department of Life Science and Technology

박테리오파아지 T7 RNA 중합효소는 어떤 전사인자도 관여하지 않는 간단한 시스템으로 파아지 RNA 중합효소와 전사촉진제만의 단백질-DNA 상호작용에 의해 전사가 진행된다. T7 파아지의 숙주 세포의 파괴에 관여하는 T7 파아지 lysozyme은 전사를 억제하고, 전사종결에 영향을 미친다. 따라서 T7 파아지 lysozyme 유전자를 대장균 발현 벡터에 삽입하여 pT7lys를 얻었고, 발현시켜 Ni-NTA column chromatography로 순수 분리하였다. T7 파아지 lysozyme은 SDS-gel에서 단일 밴드로 확인하였으며, amidase 활성 역시 확인하였다. 염기서열 특이적 전사종결에 미치는 T7 파아지 lysozyme의 역할을 알아보기 위하여, *rrnB* T1 전사종결 인자 부근에서의 전사연장 복합체 제조에 미치는 T7 파아지 lysozyme의 영향을 조사하였다. 이 결과 T7 파아지 lysozyme 존재 하에 형성되는 전사연장 복합체는 불안정함을 알 수 있었다.

T7 RNA polymerase is a single subunit RNA polymerase able to accomplish whole transcription process without auxiliary factors. T7 phage lysozyme involving in destruction of host cell wall represses T7 transcription and affects transcription termination process. Therefore expression vector pT7lys containing T7 phage lysozyme gene was constructed and expressed. T7 phage lysozyme protein was purified to homogeneity by Ni-NTA column chromatography. Also amidase activity of the purified lysozyme was identified. In order to understand the effect of the lysozyme on the

sequence specific transcription termination, T7 transcription elongation complexes at the site *rrnB* T1 transcription termination signal were made in the presence the lysozyme. The results shows that the transcription elongation complexes are unstable in the presence of T7 phage lysozyme.

I. 서 론

T7 lysozyme은 T7 파아지의 전사에서 최근에 알려진 사실은 전사 억제제로서의 역할이고, 이는 T7 RNA 중합효소의 N-terminal domain과 palm의 사이에 T7 lysozyme이 전사 개시 전에 RNA 중합효소에 결합함으로써 T7 RNA 중합효소가 전사 촉진제 DNA에 결합을 하지 못하게 하여 전사 개시를 일어나게 하지 못하게 하는 것이 밝혀졌다 (McAllister and Wn, 1978; McAllister *et al.*, 1981; Moffat and Studier, 1987; David and Thomas, 1998). 그러나 최근에는 전사 연장 단계 중 sequence 특이적 전사 종결 인자인 PTH 전사종결 인자와 관련하여 전사의 종결에 관련된 효율의 증가에도 영향을 주는 것으로 보고 되었다 (Lyakhov *et al.*, 1997) 이는 T7 lysozyme이 파아지의 전사 과정에 매우 다양하게 영향을 미치고 있으며 이를 통해서 lysozyme이 파아지가 단순히 세포벽을 와해시켜 뚫고 나오는 기능과, late gene의 발현 후 RNA 중합효소와 결합하여 전사를 더 이상 일어나지 못하게 하는 기능 이외, 전사의 종결을 촉진시키는 역할이 더 추가가 되었다고 볼 수 있다.

이와 같은 T7 lysozyme의 sequence 특이적 전사 종결과 관련한 세밀한 전사 조절을 알아보기 위하여, 전사 연장과정의 전사 연장 복합체를 단계별로 추적할 수 있는 시스템을 구축하였다. 이를 위해 biotin이 붙어있는 DNA template를 streptavidin bead로 고정시켜 일련의 활성을 가지는 안정한 단계별 전사연장 복합체를 얻을 수 있었다. 전사연장 복합체들은 전사과정에서 방사성 동위원소로 표지 되고 이들 표지된 전사연장 복합체들은 단계별로 합성하여 20-50여개의 핵산잔기들로 합성된 전사 연장 복합체들을 얻을 수 있었다. (Shen, 2000; Song, 2001)

T7 RNA 중합효소는 intrinsic termination signal은 hairpin-dependent termination과 independent termination으로 구분된다 (Macdonald *et al.*, 1994; Macdonald *et al.*, 1993). T7 파아지 genome의 late region에 위치한 T Φ 는 hairpin-dependent termination signal type의 대표적인 예이다 (Jeng *et al.*, 1990; Jeng *et al.*, 1992; Macdonald *et al.*, 1994). 두 번째 type의 hairpin-independent termination signal은 클로닝 된 human prepro- parathyroid

hormone (PTH) 유전자에서 처음으로 밝혀졌는데 nascent RNA는 secondary structure를 형성하지 않으며 down stream의 U-rich stretch는 termination efficiency에 중요하다 (He *et al.*, 1998; Hartvig and Christiansen, 1996; Kwon and Kang, 1999; Lyakhov *et al.*, 1998; Mead *et al.*, 1986). 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 (Hartvig and Christiansen, 1996; Lyakhov *et al.*, 1998; Whelan *et al.*, 1995).

본 실험실에서는 이러한 사실을 바탕으로 T7 RNA 중합효소의 sequence-특이적 전사 종결인자 중의 하나인 *E. coli* rrnB T1 terminator에서의 전사종결에 관련하여 전사 연장단계에서 어떻게 전사가 종결로 연결되는 과정에서 영향을 미치는 T7 lysozyme의 기능에 대하여 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

플라스미드 strain에 대한 host로써 *E. coli* XL-1 Blue가 사용되었고, cloned T7 RNA 중합효소의 발현은 *E. coli* BL21이 사용되었다. T7 RNA 중합 효소에 대한 T7 파아지의 유전자 1이 클로닝된 플라스미드 pAR1219 및 T7 파아지 lysozyme 유전자가 클로닝된 pLyse는 F. W. Studier (Brook National Lab)로부터 받았다. 전사 연장 복합체를 만들기 위한 플라스미드 pKA6, pUWH는 강창원 박사 (한국과학기술원 생명과학과)로부터 받았다. 방사성 동위원소 [α - 32 P] rUTP (400Ci/mmol)는 Amersham pharmacia로부터 구입하였고, Streptavidin bead는 Dynal MPC. Ltd에서 구입하였다. T7 RNA 중합 효소 및 T7 파아지 lysozyme은 실험실에서 정제하여 사용하였다 (Kim, 2001).

T7 lysozyme 발현 및 정제

T7 파아지 lysozyme의 발현을 위하여 pLysae의 lysozyme 유전자를 PCR로 증폭하여 제한효소 *NdeI* 및 *EcoRI*으로 절단하여 pET28a 벡터에 삽입하였다 (그림 1). 이렇게 하여 T7 lysozyme 유전자가 pET28a에 삽입된 pT7lys T7 lysozyme 발현 벡터를 제조하였다. 이 벡터를 *E. coli* BL21(DE3)로 transformation하여 LB kanamycine broth에서 OD₆₀₀에

서 0.5까지 키운다. IPTG를 최종 농도 0.5 mM이 되게 첨가하여 4시간 동안 진탕 배양하여 induction 시킨다. *E.coli*를 원심 분리하여 세포를 모은 후 washing buffer (20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0)에 최초 부피의 1/10 부피로 녹여 sonicator로 세포를 분쇄시키고 원심 분리하여 상층액을 다시 회수한 후 Ni-NTA affinity agarose column을 통과 시켰다. 그리고 다시 washing buffer로 column 부피의 10 배 부피로 씻어 주었고, 다시 elution buffer (250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8.0)으로 elution 하여 단일 band의 T7 파아지 lysozyme을 추출하였다.

T7 lysozyme 효소의 활성 측정 - Amidase 활성

Amidase 활성은 T7 lysozyme이 가해진 후 *E. coli* XL-1 Blue 세포의 감소하는 혼탁도를 spectrophotometer로 측정하여 기록하였다. OD₆₀₀에서 0.5까지 키운 세포에 0.1 M EDTA를 가한 후 상온에서 약 5 분동안 incubation 하고, 세포를 다시 모은 후 PBS buffer에 현탁시켜 사용하기 전까지 4°C에 보관하였다. 활성도 측정은 sensitized 세포 1 mL에 정제된 T7 lysozyme 5 μg을 가한 후 OD₆₀₀에서의 변화를 37°C에서 관찰하였다.

T7 RNA 중합효소의 전사 연장 복합체 제조 및 종결기작 확인.

T7 RNA 중합효소의 전사 연장 기작을 알아보기 위해 앞에서 언급한 pKA6 및 pUWH의 PCR product를 streptavidin bead에 고정시킨 것을 주형으로 하였다 (Kim, 2001). 처음에는 1X transcription buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 100 mM KCl)로 3번 정도 bead를 씻어주었고, 최종 buffer 농도를 1X transcription buffer 조건으로 맞추어 주었고, 1 M DTT를 10 mM 로 맞추어 넣어 주었고, T7 RNA 중합효소를 streptavidin bead와 동량으로 맞추어 넣어 주어 상온에서 5분동안 반응하였다. T7 파아지 lysozyme의 영향을 보기위해 T7 RNA 중합효소의 10배에 해당하는 T7 파아지 lysozyme을 넣어 반응하였다. 그리고 1X transcription buffer에 0.5 mM GTP와 0.5 mM ATP 그리고 0.05 mM CTP Mix 4 μl를 넣어주고 RNasin을 μl당 5 unit 정도 넣어서 약 20분간 반응하였다. 그리고 1X transcription buffer로 3번 씻었고, α-p32 UTP를 최종 농도 0.33 μM로 맞추어 넣어준 후 2분동안 room temperature에서 반응하였다. 그리고 1X buffer로 3번 씻은 후 각각의 해당 염기 서열마다 0.05 μM의 GTP Mix나 CTP, UTP, ATP solution을 첨가하여 약 2분동안 반응하였다. 각각의 반응 sample들은 약 5

μl dispense하여 stop solution (12 M Urea, 10 mM EDTA, 0.05% Bpb) 10 μl 를 넣어주어 stop 시킨 후 ice에서 보관한 후 72°C에서 2분간 열을 가한 후 8 M urea 10% polyacrylamide denaturation gel에 5 μl 씩 loading 하여 전기영동 하였다.

III. 결과 및 고찰

T7 lysozyme의 발현 및 분리

T7 lysozyme은 T7 파아지 전사 과정에서 여러 가지의 다양한 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 그 중에서 대표적으로 파아지가 숙주세포에 감염을 한 후 파아지가 세포 내에서 성공적으로 복제된 후 세포벽을 뚫고 나올 때, lysozyme이 작용하여 세포벽을 뚫고 나오게끔 하는 amidase 활성이 있고, RNA 중합효소가 전사 촉진제와 결합하여 전사 시작하기 이전에 RNA 중합효소의 전사 촉진제 결합부위에 결합하여 RNA 중합효소와 전사 촉진제 DNA와 결합을 할 수 없게 되어 전사 활성을 억제시키는 작용을 한다고 보고되었다 (McAllister and Wn, 1978; McAllister *et al.*, 1981; Moffat and Studier, 1987; David and Thomas, 1998). 그리고 최근에는 sequence 특이적 전사 종결기작에서 lysozyme이 전사 종결의 효율을 증가시킨다는 보고가 있어 (Lyakhov *et al.*, 1997), 본 실험실에서는 이러한 T7 파아지 lysozyme의 작용이 전사 종결 효율에 미치는 영향을 알아보았다.

먼저 N-terminal 쪽에 6개의 histidine tag를 붙일 수 있는 pET28a 플라스미드에 T7 파아지 lysozyme 유전자를 삽입시켜 IPTG로 발현할 수 있는 벡터 pT7lys를 제조하였다 (그림 1). 이 벡터를 가진 *E.coli*를 IPTG로 유도시켜 lysozyme 유전자를 발현시켰고, 그 결과 약 17 KDa 크기의 재조합 단백질을 얻을 수 있었다. 이 단백질들은 주로 세포추출물에 용해된 상태로 유도되어서 Ni-NAT column을 이용하여 정제를 하였고 약 250 mM의 imidazole elution buffer에서 단일 band를 확인할 수 있었고 이를 실험에 사용하였다 (그림 2).

발현 분리한 T7 lysozyme은 본 실험실에서 수행해왔던 K11 lysozyme과 크기와 작용기작이 거의 유사하다고 알려져 있다 (Yoon, 2000). 그러나 K11 lysozyme과는 달리 37°C에서 IPTG로 유도시켜 발현했으나 잘 용해가 되어 Ni-NAT agarose column으로 쉽게 정제가 가능하였다. 이렇게 얻어진 lysozyme의 활성도를 측정해 본 결과 lysozyme의 고유의 활성을 가지는 것으로 나타났고, 이렇게 얻어진 lysozyme으로 전사 연장기작에서의 전사 종결에 영향을 미치는지 조사 해 볼 수 있었다 (그림 3)

그림 1. T7 파아지 lysozyme의 발현을 위한 벡터 pT7lys 제조.

그림 2. T7 파아지 lysozyme의 발현 및 분리과정. (A) IPTG로 37에서 발현시킨 T7 파아지 lysozyme의 발현. lane 1: uninduced, lane 2 : induced, lane 3: soluble fraction, lane 4: insoluble pellet fraction, lane 5 : size marker. (B) T7 파아지 lysozyme의 분리 과정. lane 1: soluble supernatant, lane 2: Ni-NTA column unbound fraction, lane 3: 30 mM imidazole washing fraction, lane 4-6: 250 mM imidazole elution fraction, lane 7: size marker.

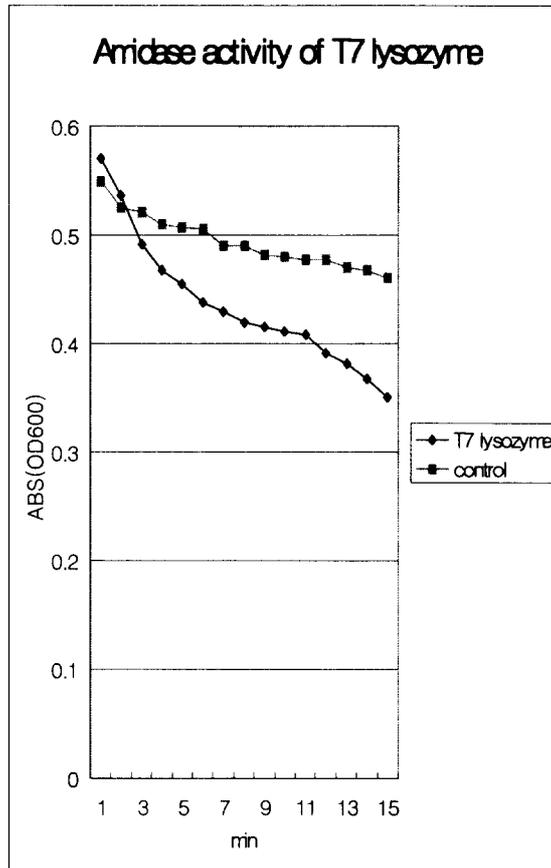


그림 3. T7 파아지 lysozyme amidase 활성도 측정 assay.

전사 연장 단계의 전사연장복합체 제조

T7 RNA 중합효소를 가지고 전사 연장 복합체를 제조하기 위하여 5'쪽에 biotin이 붙어있는 primer를 가지고 pKA6 플라스미드를 PCR하여 streptavidin bead에 붙여서 walking 실험을 수행하였고, 그 결과 22~41mer의 안정적인 전사 연장 복합체를 얻을 수 있었다 (그림 4). 이와 같은 안정적인 전사 연장 복합체를 확인할 수 있었고, 이 시스템을 이용한 전사연장 단계에서의 전사연장 복합체를 단계 별로 확인하여 전사연장 단계에서의 변화에 관한 단서를 제공하는 시스템을 확립하였다.

pKA6 DNA sequence

GGGAGACCAC AACGGTTTAA ATCTAGCGGG ATCCGGCTGC TAACAAAGCC GAAAGGAAG

그림 4 T7 RNA 중합효소의 전사연장 복합체 합성.

전사 연장 단계에서 전사 종결 인자 *rrnB* T1, site B에서 T7 파아지 lysozyme이 미치는 영향 조사

T7 파아지 lysozyme은 앞의 서론에서 언급했듯이 sequence-특이적 전사 종결인자가 나올 경우에 특이적으로 전사 종결의 효율에 결정적인 영향을 미친다고 보고 되었다. 특히 특정부분을 중심으로 돌연변이 시킨 T7 RNA 중합효소를 각각의 전사 종결인자에 적용시키는 연구가 활발하게 진행되고 있고, 본 실험실에서도 이러한 점에 착안하여 전사 종결인자에 영향을 주는 돌연변이 T7 RNA 중합효소들과 T7 파아지 lysozyme의 기능에 대한 연구를 진행하고 있다. 특히 전사 종결인자 부근에서의 전사 연장 단계는 각각의 돌연변이 마다 조금씩의 활성도의 차이를 보이고 있고, 그에 따른 보충적인 실험은 계속 진행 중에 있다.

rrnB T1 site B 종결인자는 *E.coli*의 전사 종결에서 Rho-factor independent termination의 loop의 구조 중 U-rich 부분의 sequence 부근의 'ATCTGTT'의 특이적인 sequence 부분에 전사물이 종결되는 것이 최근 알려졌다. 파아지 전사 시스템에서 이러한 특이적인 sequence는 PTH terminator나 CJ terminator에서도 발견이 되는데 이러한 sequence에서 termination이 되는 이유는 아직 명확하게 알려지지 않았다.

본 실험실에서는 이러한 전사 연장단계에서의 *rrnB* T1, site B 전사 종결인자의 작용 기작을 알아보았다. 그 결과 sequence 특이적 종결인자부근에서 전사의 연장단계의 종결이 일어나 더 이상 전사연장단계가 일어나지 않았다 (그림 5A). 이러한 특이적인 종결인자에서는 RNA 중합효소가 전사 촉진제를 인지하여 전사 개시를 하듯이 어떠한 RNA 중

합효소의 3차원적 구조의 변화가 일어나거나 아니면 전사물의 결합력의 영향으로 전사가 종결되는 것으로 추측된다. 또한 T7 파아지 lysozyme이 전사연장기작에서의 전사종결에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, T7 lysozyme은 전사 연장단계 이전에 반응한 전사 연장 단계에서는 전사 연장조차 억제시키는 것으로 나타났다 (그림 5B). 이는 전사 개시 전에 lysozyme이 RNA 중합효소와 결합하여 전사 개시를 하지 못하게 하는 것으로 추측이 되고 *rrnB* T1 site B 종결인자 부근에서 stop시킨 band의 정도가 lysozyme이 없는 것에 비해 희미한 것으로 보아 불안정한 전사연장 복합체가 형성되는 것으로 추측된다.

(C) *rrnB* T1, Site B terminator sequence (pUWH)

5'- GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAGGA TCCGTTTTAT
 CTGTTGTTTG TCGGTGAAAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT
 AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT -3'

그림 5. *rrnB* T1 site B 전사종결부위에서의 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 합성. (A) T7 RNA 중합효소만을 이용하여 제조한 단계별 전사연장 복합체, (B) T7 파아지 lysozyme이 첨가된 T7 RNA 중합효소의 반응으로 제조한 단계별 전사연장 복합체, (C) 전사주형으로 사용된 *rrnB* T1 전사종결 부위의 DNA 염기서열, 밑금친 염기는 단계별 전사연장 복합체 stop 위치임.

IV. 감사의 글

이 논문은 2003년도 배재대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사함을 표합니다.

V. 참고문헌

- David, J. and Thomas A. S. (1998) Structure of T7 RNA polymerase complexed to the transcriptional inhibitor T7 lysozyme *EMBO J.* **17**, 4101-4113
- Hartvig, L. and Christiansen, J. (1996) Intrinsic termination of T7 RNA polymerase mediated by either RNA or DNA. *EMBO J.*, **15**, 4767-4774.
- He, B., Kukarin, A., Temiakov, D., Chin-Bow, S.T., Lyakhov, D. L., Rong, M., Durbin, R. K. and McAllister, W. T. (1998) Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18802-18811.
- Jeng. S. T., Gardner, J. F., Gumport, R. I. (1990) Transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase at rho-independent terminators. *J. Biol. Chem.* **265**, 3823-3830.
- Jeng. S. T., Gardner, J. F., Gumport, R. I. (1992) Transcription termination in vitro by bacteriophage T7 RNA polymerase. The role of sequence elements within and surrounding a rho-independent transcription terminator. *J. Biol. Chem.* **267**, 19306-19312.
- 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.
- Kwon, Y. S. and Kang, C.(1999) Bipartite modular structure of intrinsic RNA hairpin-independent termination signal for phage RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **274**, 29149-29155.
- Lyakhov, D. L., Biao He, Xing Zhang, F. W. Studier, Dunn J. J., McAllister, W. T. Lyakhov, D. L (1997) *J. Mol. Biol*, **269** , 28-40.

- 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.
- McAllister, W. T. and Wn, H. L. (1978) Regulation of transcription of the late genes of bacteriophage T7. *Proc. Natl, Acad, Sci. USA* **75**, 804-808
- Macdonald, L. E., Durbin, R. K., Dunn, J. J. and McAllister, W.T. (1994) Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **238**, 145-158.
- Macdonald, L. E., Zhou, Y. and McAllister, W. T. (1993) Termination and slippage by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **232**, 1030-1047.
- Mead, C. T., Muller, D. K. and Coleman, J. E. (1986) Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng.* **1**, 67-74.
- Moffatt, B. A. and Studier, F. W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, **49**, 221-227.
- Shen. H. (2000) Elongation transcript binding to T7 RNA polymerase. Ph. D Thesis, KAIST. Taejon. Korea.
- Song. H. (2001) Sequence-specific transcription termination by bacteriophage T7 RNA polymerase. Ph. D Thesis, KAIST. Taejen. Korea.
- Whelan, S.P., Ball, L. A., Barr, J. N. and Wertz, G. T. (1995) Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8388-8392.
- Yoon, J. (2000) Cloning and expression of Klebsiella phage K11 lysozyme gene and inhibition of K11 RNA polymerase by K11 lysozyme. Master Degree Thesis, Pai Chai university, Taejon, Korea.