

Allantoin 분해 유전자들의 발현 유도에 관여하는 세가지 요소 (UAS, URS, UIS)

유 향 속

한국과학기술원 유전공학센터

효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 allantoin은 분해유전자들에서 생성되는 효소들에 의해 ammonia와 CO₂로 분해되면서 이때 생성되는 ammonia가 질소원으로 사용된다. Allantoin이 분해되는 과정에는 5개의 structural gene과 4개의 transport gene이 관여되며 (Fig. 1) 이 유전자들의 발현은 두개의 regulatory gene에서 생기는 regulatory element들에 의해서 조절된다. 이 유전들의 발현조절은 transcription 상에서 일차적으로 일어나며 질소원에 따라 발현

되는 정도가 다르다. Transcription의 유도는 inducer인 allophanic acid나 allophanic acid의 structural analog인 oxaluric acid에 의해 일어나며 이 과정에 negative regulatory element인 DAL 80 gene product와 positive regulatory element인 DAL 81 gene product가 관여한다. Allantoin 분해 유전자들이 inducer에 의해 발현이 유도되어 transcription이 유도되는 정도에는 각 유전자마다 차이가 있으며 유도되는 정도에 따라 highly inducible한 gene, moderately

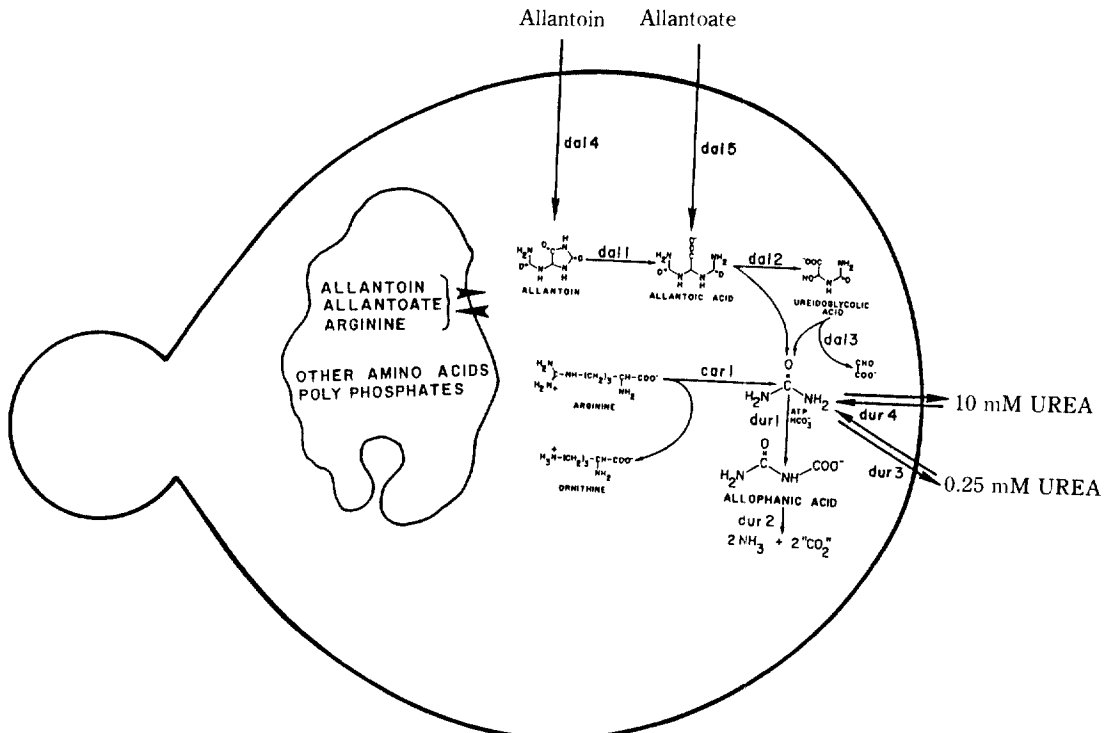


Fig. 1. Allantoin degradation pathway.

inducible한 gene, constitutive한 gene으로 나눌 수 있다.

Highly inducible한 gene으로는 *DAL 4*, *DAL 7*, *DUR 1,2*를 들 수 있고, moderately inducible한 gene으로는 *DAL 1*, *DAL 2* 그리고 constitutive하게 유도되는 gene으로는 *DAL 3* 및 *DAL 5*를 들 수 있다. 이들 allantoin 분해에 관여하는 일련의 유전자들이 그 유도되는 정도의 차이는 있으나 공통적으로 positive 및 negative regulatory element들과 작용하여 발현이 조절되고 있다. Allantoin 분해 유전자들의 발현유도가 조절되는 기전을 설명하고자 각 유전자들의 promoter 부위를 deletion 분석방법 및 promoter fusion 방법을 이용하여 연구한 결과 그 기전을 다음과 같은 working model로서 설명할 수 있었다(Fig.2). 즉 allantoin 분해 유전자들의 발현유도에는 적어도 세 종류의 promoter상의 DNA sequence들이 필요한데 그 하나는 UAS (upstream activator sequence), 둘째는 URS (upstream repression sequence), 셋째는 UIS (upstream induction sequence)이다. 이들 세 종류의 sequence들은 상호작용하여 분해유전자들의 발현을 유도하고 있어 그 하나 하나의 기능을 설명하기로 한다.

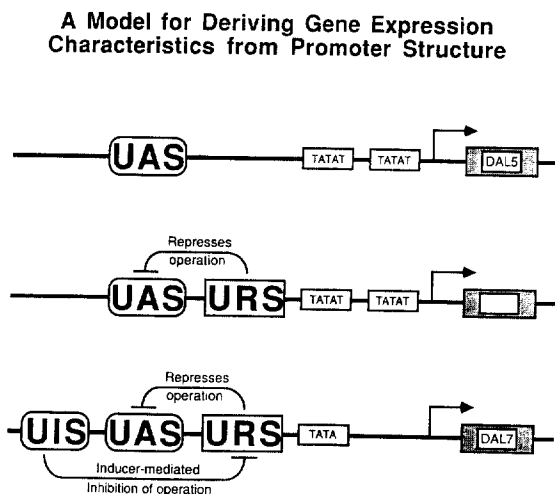


Fig. 2. Working model for the promoter organization of the constitutive *DAL5* and inducible *DAL7* gene in *Saccharomyces cerevisiae*.

2. 실험방법

Allantoin 분해 유전자들중 highly inducible한 *DAL 7*, *DUR 1,2* 및 constitutive한 *DAL 5* gene의 promoter를 deletion 방법에 의해 발현에 필요한 최소 DNA sequence 부위를 정한 후 이 DNA sequence를 다시 oligonucleotide 합성방법에 의해 합성하여 *Cyc 1-LacZ* expression vector에 삽입하여 효모내에서 *LacZ*의 발현이 삽입한 DNA sequence에 의해 영향을 받는 정도를 측정하여 (β -galactosidase activity) deletion 방법에 의해 결정된 이 DNA sequence들이 직접 발현유도에 관여하는가를 조사하였다.

3. Upstream Activation Sequence(UAS) element

UAS element는 allantoin 분해 유전자들의 promoter상에 항상 존재하는 sequence element로서 그 핵심 sequence는 $5'GATAAG3'$ 이거나 이

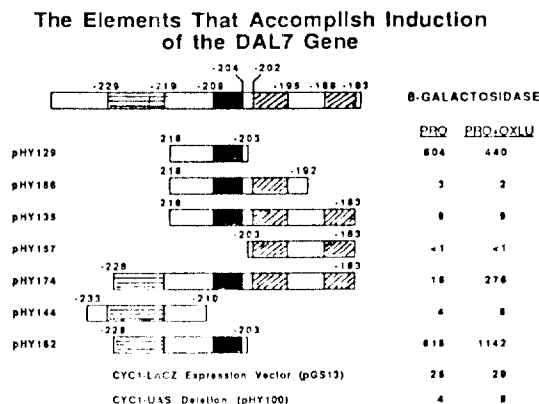


Fig. 3. *LACZ* expression mediated by synthetic oligonucleotides derived from the upstream region of the *DAL7* gene cloned into a *CYC1-LACZ* expression vector pHY100. Positions are given relative to the *DAL7* coding region. After transforming yeast strain RH218 with plasmids shown in the figure, β -galactosidase activity was assayed in the cells grown in yeast carbon-base medium containing proline as sole nitrogen source. Yeast cultures were grown in either the presence (PRO + OXLU) or absence (PRO) of inducer.

의 reverse complement sequence인 ^{5'}CTTAT-C^{3'}이다. 이 hexamer sequence는 positively-acting transcription factor가 작용하는 target site로써 transcription을 항상 일으키게 하는(constitutively) sequence라 생각된다. 이 UAS 단독으로 transcription의 activation이 inducer의 유무에 관계없이 항상 일어날 수 있고, allantoin 분해 유전자들의 promoter상에 여러 copy씩 존재한다. 이 hexamer sequence는 효모의 다른 유전자(그 예로 *Cyc1*)의 promoter상에 삽입시켰을 때 이 sequence로 인하여 뒤에 연결된 *LacZ*의 transcription이 activation됨을 알 수 있다(Fig. 3의 pHY 129). Fig. 3의 pHY 129는 ^{5'}GATAAG^{3'} sequence(혹색부분)가 있는 *DAL7* promoter상의 -218에 -203사이의 15개 sequence를 합성하여 *Cyc1* promoter중 *Cyc1* 자체의 UAS가 없는 *Cyc1-LacZ* vector인 pHY 100에 삽입시켰을 때 삽입한 *DAL7*의 UAS에 의해 *Cyc1*

promoter에 활성이 생겨 그 뒤에 연결된 *LacZ*의 발현이 일어나 β -galactosidase의 activity가 나타남을 보여주고 있다. 이때 inducer인 oxaluric acid(oxu)를 첨가하여도(pro + oxu) β -galactosidase가 활성화되는 정도는 inducer가 없을 때(pro)에 비해 별다른 차이를 나타내지 않음을 볼 수 있다. Inducer와는 무관하게 transcription의 활성화를 시킬 수 있는 UAS의 핵심 sequence인 ^{5'}GATAA^{3'}는 단지 allantoin 분해 유전자의 promoter상에만 존재하는 것이 아니고 효모의 다른 여러 유전자들의 promoter에도 존재함이 보여지고 있다(Fig. 4). 그 외에도 Fig. 5에서 보는 바와 같이 *neurospora*나 *chicken*, phage λ 등의 각 유전자의 promoter상에서도 존재함이 밝혀졌으며 *neurospora*나 *chicken*의 유전자들에서 발견된 ^{5'}GATAA^{3'} sequence는 실제로 transcription activation factor가 binding하는 sequence라는 것도 알려졌다. Allantoin 분해 유

Homology Between the DAL7 Activator Sequence and Similar Sequences in Other Yeast Genes

DAL7	-352	t a g a t	G A T A A T	a c a a a
	-290	a a a c c	G A T G A A	a t t a c
	-276	a l g t c	G A T A A T	c g t a a
	-254	g g l g c	G A T A G A	a l a c c
	-199	t a l g t	G A T A A G	a a a a g
GDHN	-166	t c c a a	G A T A A G	c c a a a
	-172	t c c t g	G A T A A G	g l a c a
	-139	a g a t t	G A T A G T	t t c g t
	-700	g c l g c	G A T A A A	g a g t c
	-584	g g c t g	G A T A A G	a g g a t
DAL5	-449	g g l c a	G A T A A G	g g t t a
	-414	t c l g c	G A T A A G	a a t a l
	-309	c a g c t	G A T A A c	a g c t t
	-396	c a a a t	G A T A G c	t c c t c
	-398	t t g c t	G A T A A G	g g t g c
MES1	-352	t t t l c	G A T A A G	a g l c c
	-260	g c c c c	G A T A A t	c c c a c
	-220	t t g g t	G A T A A c	g l t c l
	-161	a t a a t	G A T A A G	t a t t a
	-155	a a c c a	G A T A A t	g a t a a
ARG4	-141	g a l t g	G A T G A A	g l a a t
	-299	t c g a t	G A T A A T	g g t g t
	-271	a g a t c	G A T A G G	a l a c a
	-246	a c a a a	G A T A A t	c a t a g
	-131	c t l t c	G A T A A g	t l g c g
CAN1	-190	t a g t a	G A T G A A	t g a c t
	-170	t t l t g	G A T A A G	c l g g c
	-93	t c l g a	G A T A A G	a c t a c
	-291	a a g a c	G A T A A G	g l t a a
	-280	g t l a a	G A T A A G	t a g a t
CAR1	-272	a a g t a	G A T A A G	a g a a t
	-416	a c a t t	G A T A G G	t c a g g
	-406	t t l a t	G A T A A A	c a t t g
	-404	a c a c t	G A T A A A	c c c c a
	CPB2	-453	g t g t t	G A T A A t
-352		t a l a a	G A T A A t	t g c a c
-191		a a a a t	G A T A A A	a c a a a
-470		t a a a a	G A T A A A	c g a a a
-397		a g a a c	G A T A A t	g t a t g
Histone H4 (copy I gene)	-151	l g a t g	G A T A A A	t l g g t
RPL25	-525	g t a a t	G A T A A G	c c t c c
	-485	l a c a a	G A T A A G	a a a c t
	-88	l a a a a	G A T A A t	a t c t a
Trp2	-646	t a a t t	G A T A A A	g a g a g
	-458	t c c t t	G A T A A C	a g a a c
	-257	a l g c t	G A T A A A	a l g g a
Ty1 Delta	+65	t a t a t	G A T A A T	t a t a t
	+130	g g a t t	G A T A A t	g t a c t
	+171	a c g a t	G A T A A t	a a l a t
2μ	+5301	c t t g t	G A T A A A	a a g l t
	+5510	t a c a a	G A T A A A	l a g a g
ADR2	-684	c c a t a	G A T A A G	a g c a t
	-83	g a a g l	G A T A A A	a a c a a
ARG4	-170	t t t t g	G A T A A G	c t g g c
	-93	t c t g a	G A T A A G	a c l a c
AT91	-186	a a g a a	G A T A A t	l a a t a
	-130	a a a a a	G A T A A t	a l t a a
CPA2	-256	t c a g a	G A T A G G	a a c c t
	-103	a a a g a	G A T A A G	g c a t a
CRO1	-38	a t t c t	G A T A A A	t t g t c
	-147	g a c c c	G A T A A A	a a c c g
CYC1	-347	g c t t a	G A T A G t	c t a l g
	-252	t l g a a	G A T A A A	g g g a c
GAL1	-519	g c t a a	G A T A A t	g g g g c
	-229	a g g a l	G A T A A t	g c g a t
HIS1	-589	t c a a a	G A T A A t	c t a c t a
	-296	l c a t l	G A T A A c	a g c g t
Histone H4 (copy II gene)	-507	l g c g l	G A T A A c	a g c g t
	-461	l g g g c	G A T A A t	g a a c g
MFA1	-211	l g t t l	G A T A A A	t g a g a
	-143	t t t t g	G A T A A G	t a c a t
PHO5	-175	a a t t l	G A T A A t	t t g g c
	-144	l t t g g	G A T A A G	g g t a a
PUT2	-398	g g t g l	G A T A A c	t l t g g
	-179	g c g t a	G A T A A G	c a l t g
RAD1	-526	a c c g l	G A T A A c	a g a t g
	-190	c a g g a	G A T A A G	c a g a g
STE3	-662	a c c g l	G A T A A c	a t a a e
	-530	g t l c l	G A T A A t	t g c a l
SUC2	-718	a a c a l	G A T A A A	a l g g a
	-434	c c c c g	G A T A A t	t t c c l

Fig. 4.

Ubiquitously Occurring Activation Sequence

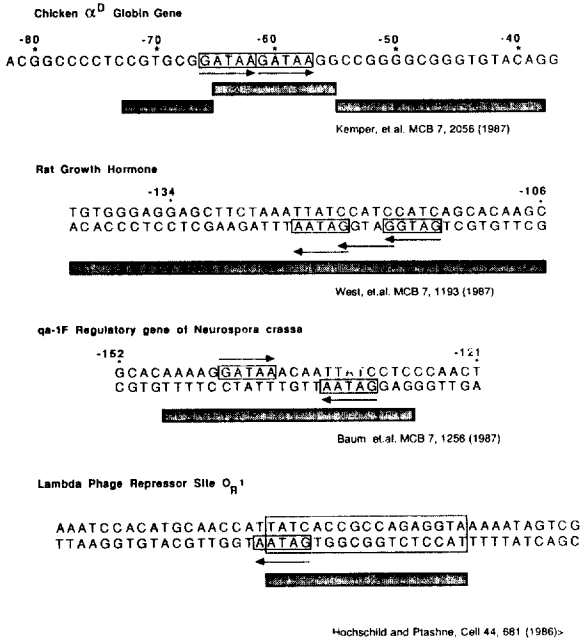


Fig. 5. Upstream activation sequences containing GATAA motifs in promoters of other genes.

전자들의 promoter상에서 이 유전자들의 transcription activation에 관계하는 것으로 밝혀진 UAS, 5'GATAA3' sequence는 allantoin 분해 유전자들 뿐만 아니라 다른 유전자들의 promoter에도 존재하므로 어떤 특정한 유전자에만 사용되는 sequence element가 아니라 일반적으로 사용되는 어떠한 공통적인 transcription activator와 작용하는 sequence element임을 추정할 수 있다. 단지 이 5'GATAA3' sequence가 공통적으로 작용하는 sequence인지 아닌지는 효모의 다른 유전자들 promoter상에서 발견된 5'GATAA3' sequence가 그 단독으로 그 유전자들의 발현 활성화에 관여하는지 여부를 조사해 봄으로써 일반적으로 쓰이는 activation sequence인지 아닌지를 알 수 있을 것이다.

4. Upstream Repression Sequence(URS) element

URS element는 그 핵심 sequence가 5'-CA-

TAAATT^{3'}로서 UAS의 기능을 억제하는 element이다. UAS가 positive transcription factor에 의하여 activation될 때 URS element가 인접하여 존재하면 UAS의 activation을 막게 된다. Fig. 3의 PHY 156에서 보는 바와 같이 DAL7 promoter상에 있는 UAS element를 가진 sequence(PHY 129)에 인접하여 11 base pair를 더하였을 때(-218에서 -192) UAS가 가지고 있던 transcription activation이 전혀 일어나지 않아 β-galactosidase의 activity를 측정할 수 없었다. 이 11 base pair가 있으므로써 5'GATAA^{3'}를 핵심으로하는 UAS element의 기능이 억제되므로 이 11 base pair안에 UAS의 기능을 억제하는 repression sequence(사선친부분)가 있음을 알 수 있다. 이 repression sequence는 단독으로는 아무런 활성을 나지 못한다. Fig. 3의 PHY 157에서 보는 바와 같이 11 base pair만을 따로 Cyc 1의 UAS가 없는 Cyc 1-LacZ vector(PHY 100)에 연결시켰을 때 β-galactosidase의 활성에 아무런 영향을 보이지 않음을 알 수 있다(PHY 100와 비교). URS는 DAL7 promoter에서의 activator element인 5'GATAA^{3'}를 가진 UAS를 불활성화시키는 이외에도 다른 유전자의 promoter상에서 UAS 역할을 하는 sequence들도 그 위치에 따라 억제할 수 있다. Fig. 6의 PHY 230에서 보는 바와 같이 -5'CATAAATT^{3'}

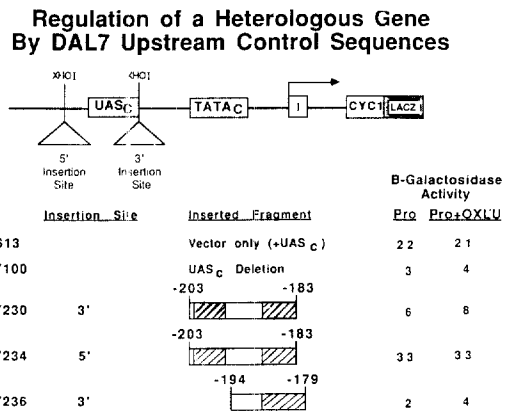


Fig. 6. Repression of the CYC1 USA by synthetic oligonucleotide fragments derived from the upstream region of the DAL7 gene. Plasmids containing one copy of the fragment were transformed and assayed for β-galactosidase activity.

- sequence를 포함하고 있는 *DAL7* promoter 상의 sequence (사선친부분, -203에서 -183)를 합성하여 *Cyc 1* 자체의 UAS를 가지고 있는 plasmid PGS 13에 *Cyc 1* UAS의 3'쪽에 삽입하여 (XhoI site) 넣었을 때 *Cyc 1* 자체의 UAS activity가 저해됨을 알 수 있었다. *DAL7* promoter 상에서 URS로 추정된 ^{5'}CATAAATT^{3'} sequence는 효모의 다른 몇가지 유전자들의 promoter 상에서도 발견이 되고 있으며 이 sequence들이 각 유전자들에서 repression sequence로서 직접작용하는지는 알 수 없으나 이 sequence가 *Cyc 1* promoter의 UAS를 약화시키는 것으로 보아 부분적으로나마 repression sequence로 작용할 것이 가능하리라 생각된다.

5. Upstream Induction Sequence (UIS) element

세번째 element는 UIS로서 이 element는 inducer에 의한 transcription의 유도를 일으키게 하는 sequence로 생각된다. 그러나 UIS 단독으로는 transcription을 유도할 수 없으며 반드시 UAS element가 있어야 transcription의 유도를 일으킬 수 있다. Fig. 3의 PHY 144, PHY 162 및 PHY 174를 비교해 볼 때 plasmid PHY 144는 *DAL7* promoter 상에서 deletion 분석에 의해 밝혀진 induction에 관여하는 DNA sequence만을 (직선친부분) 따로 합성하여 (-233에서 -210까지) *Cyc 1* 자체의 UAS가 없는 *Cyc 1-LacZ* vector (PHY 100)에 삽입한 후 *LacZ*의 발현을 조사했다. 이 plasmid를 함유한 효모에서는 β -galactosidase의 activity가 거의 나타나지 않았다. 그러나 이 sequence에 UAS(혹색)가 같이 인접하여 있는 plasmid PHY 162를 함유한 효모에서는 *LacZ*의 발현이 일어나며 inducer가 있을 경우에는 (pro+oxu)는 발현 정도가 증가됨을 알 수 있다(616 및 1142 unit).

Inducer가 없는 경우에 plasmid PHY 162는 UAS만 있는 plasmid PHY 129와 비슷한 정도의 *LacZ* 발현을 일으키므로(616 및 504 unit) 이때

UIS는 별로 그 작용을 하지 않음을 알 수 있고 다만 inducer가 존재하면 비로서 UAS가 transcription을 유도하는 정도를 높여주므로써 *LacZ*의 발현이 증가된다고 본다. 이때 URS element도 같이 있게 되면 inducer에 의해 induction되는 비율은 더욱 증가함을 볼 수 있다. Fig. 3의 plasmid PHY 174에서 보면 UIS와 UAS가 있는 plasmid PHY 162에 URS가 더 붙은 경우인데 이때는 inducer가 없는 경우에 (pro) URS의 작용에 의해 UAS작용이 억제되어 발현이 적게 일어나고 있다(15 unit). 이에 비하여 inducer가 있을 경우에는 (pro+oxu) 발현이 19배나 증가됨을 (276 unit) 볼 수 있다. 그러나 URS가 없을 때 비해서 발현되는 절대량은 낮다 (PHY 162와 PHY 174의 비교).

6. UAS, URS, UIS의 상호작용

이상의 세가지 element로 구분지은 allantoin 분해유전자들의 promoter 상의 조절 sequence들이 서로 어떠한 관계를 가지며 발현유도에 작용하는가를 요약하면 다음과 같다. UAS의 역할은 inducer와는 상관없이 항상(또는 basal level) transcription이 일어나도록하는 기본기능을 하는 것이며, URS는 UAS에 의하여 transcription이 일어나는 작용을 억제하여 발현이 불필요할 때 UAS의 기능을 막으므로써 allantoin 유전자들의 발현을 방지하게 된다.

UIS의 기능은 URS가 UAS의 기능을 억제하는 것을 방지하여 UAS가 그 본래의 기능을 발휘하도록 한다. 이때 inducer가 직접 혹은 간접적으로 관여한다고 생각된다. 그러므로 allantoin 분해유전자들이 inducer에 의해 발현이 유도되는 과정에는 이 세가지 element들이 상호억제작용을 하여 최종적으로 UAS의 기능을 활발히 함으로써 일어난다고 본다. 종래에 유전자들의 발현이 유도되는 것은 positive한 방법이라고 생각되어 왔으나 allantoin 분해유전자들의 발현 유도는 두개의 negative 방법이 합쳐져서 결국 positive하게 발현되는 것으로 생각된다.