

락토스 오페론에서 Cyclic AMP Receptor Protein에 의한 두 결합 부위(CRP1과 CRP2)의 결합 특성에 관한 연구

- 단 보 -

강종백^{1*} · 권 건

경원대학교 화학과

The Binding Affinities of Two Binding Sites(CRP1 and CRP2 Sites) by Cyclic AMP Receptor Protein at Lactose Operon

Jong Back Gang^{1*} and Kun Kwon

Department of Chemistry, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Korea

Abstract

Lactose operon contains two CRP binding sites at promoter(CRP1 site) and operator(CRP2 site) regions at *lac* operon. CRP protein can bind to both sites with the different binding affinity. CRP1 site, major CRP binding site, acts the transcription activation with the fully unknown mechanism by binding of CRP. In this study, the binding affinities of CRP1 site and CRP2 site were measured with the fluorescein-labeled oligomers, which contain CRP1 site and the three different spacing sequences between GTGA and TCAC at CRP2 site. Results showed that CRP:cAMP complex bound to CRP1 site 3 times more strongly than CRP2 site and the base spacing between GTGA and TCAC was not the only factor to affect the binding affinity of CRP to CRP2 site.

Key words -- CRP(or CAP), DNA binding affinity, CRP1 site, CRP2 site

cAMP receptor protein(CRP)은 여러 종의 많은 bacteria 유전자의 전사(transcription)과정을 활성화(activation)시키는 단백질이다[9,12,13]. CRP는 두 개의 동일한 subunit으로 된 homodimer이고 하나의 subunit은 209개의 아미노산으로 구성되며 분자량은 45,000Da이다[2,15]. 각각의 subunit는 C-terminal domain과 N-terminal domain으로 구성되어 있는데 N-terminal domain은 1-135 아미노산을 포함하며 cAMP 결합 부위를 지니고 있다. 그리고 C-terminal domain은 136-209 아미노산을 포함하고 DNA 결합에 관

여하는 helix-turn-helix motif가 존재한다[11,16]. CRP는 cAMP 농도가 micromole 일 때 CRP:cAMP complex 형태가 우세하며 millimole 일 때 CRP:(cAMP)₂ 형태로 존재한다[6]. 그 중에서 활성인 형태는 CRP:(cAMP)₁ 이다. 락토스 오페론의 프로모트 위쪽에 위치한 첫 번째 CRP 결합 위치인 CRP1 부위(-45~-75 지역)와 그리고 RNA polymerase와 *lac* repressor 결합 부위에 위치한 두 번째 결합 위치인 CRP2 부위(-5~+25 지역)가 있다[14]. CRP1 부위를 보면 GTGA와 TCAC 사이에 6개의 염기들 즉 GA와 TC를 포함하여 거의 one helix(10.3 base pair/one turn helix) 간격이므로 GT와 AC가 동일한 면에 위치하고 있다. 그래서 CRP 단백질이 결합 할 때 동일한 면을 이용하여 결합할 것이다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 031-750-5409, Fax : 031-750-5389
E-mail : jbgang@kyungwon.ac.kr

이와 대조적으로 CRP2 부위는 GTGA와 TCAC 사이에 13개의 염기가 있으므로 즉 GT와 AC 사이에 17개의 염기가 존재해서 GT와 AC가 1.5 helical turn이므로 서로 반대편에 위치하고 있다.

본 연구는 CRP1 부위와 CRP2 부위에 대한 CRP 단백질의 결합력을 관찰하였으며 또한 CRP2 부위에 CRP 단백질이 결합할 때 TCAC의 역할과 중요성을 알기 위해 GTGA와 TCAC 사이의 간격을 변화시킬 때, 즉 13개 염기 간격인 DNA2를 6개 염기 간격인 DNA3 그리고 6개 간격 및 원래 존재하는 TCAC를 CTCA로 변화시킨 DNA4를 이용하여 CRP 단백질의 결합력을 관찰하였다. 이 연구에 DNA-단백질 혹은 단백질-단백질 사이의 상호작용 연구에 이용되는 형광물질을 이용하였다.

CRP 단백질은 crp 유전자가 expression vector인 pRE2에 클론된 pRE2crp와 온도에 민감한 repressor 단백질을 포함하는 pRK248을 이용하였다[4]. 그리고 숙주세포로 CA8445를 이용하였으며 37°C에서 배양한 후 42°C에서 heat induction하여 대량으로 생산하였다. 이어 P-11, Hydroxyapatite, CM sephadex, Affi-gel blue 등의 수지를 이용하여 분리한 뒤 12.5% SDS-PAGE로 확인한 결과 95% 이상 순수하였다. 그리고 분리된 CRP의 확인을 위하여 cAMP의 존재 유무에 따라 proteolytic digestion을 통하여 CRP를 확인하였다[1].

Fig. 1에서 보듯이 사용된 oligomer는 CRP1 부위와 CRP2 부위의 염기서열 또는 염기서열을 변화시킨 oligomer들의 5' 끝에 형광물질인 fluorescein을 부착하였다. 그리고 DNA 결합측정은 transcription buffer(100mM KCl, 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 1M DTT, 5% glycerol)에서 100nM DNA, 200 μM cAMP 농도에서 최종 부피가 500 μl가 되게 하여 37°C에서 fluorometer(Horiba사의 FluoroMax-3 모델)로 측정하였다. 그리고 fluorescein이 부착된 oligomer의 농도가 증가함에 따라 형광의 세기가 직선적으로 증가함이 확인되었다. CRP 단백질의 결합실험은 CRP의 농도가 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 1.8, 2.2, 그리고 2.6 μM이 되도록 첨가하여 1분간 반응시킨 후 490nm의 excitation 파장과 520nm의 emission파장에서 quenching 값을 3회 반복하여 측정하고 평균값을 사용하였다.

Fig. 2에서 보듯이 cAMP가 있을 때 야생형 CRP에 의한 4가지 DNA의 결합 특성을 보여준다. 야생형 CRP의 DNA

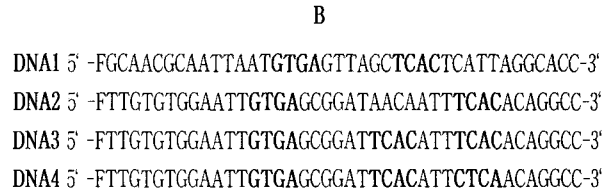
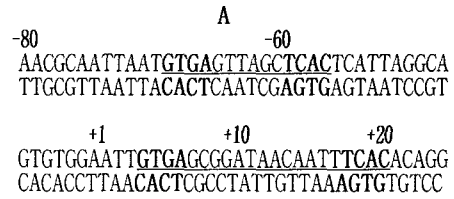


Fig. 1. DNA sequence of lactose promoter region(A) and synthetic oligomers used in DNA binding assay (B). The underlined sequences are shown in panel A around -60 and +10 for CRP1 and CRP2 sites, respectively. Panel B shows the fluorescein-labeled oligomers, which is denoted as F at 5' end, used in DNA binding assay.

의 결합은 DNA1, DNA2, DNA3, DNA4의 순서로 결합력이 증가되는 것으로 나타났으며 이것은 CRP1 부위를 가진 DNA1이 CRP2 부위를 가진 DNA2보다 3배, DNA3보다 6.6배, DNA4보다 9배 결합력이 우수하다. Fig. 1에서 보듯

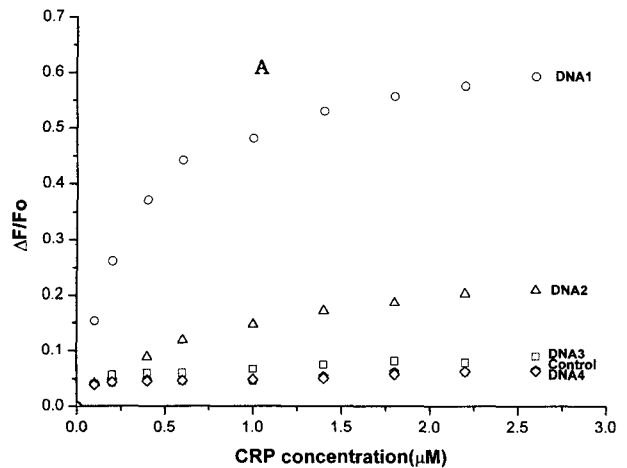


Fig. 2. The fluorescent quenching plot of wild-type CRP(A).

Reactions were conducted at 200 μM cAMP and 100nM DNA. Reaction condition was mentioned in the text. F₀ and F are the fluorescent intensity in the absence or presence of CRP, respectively. ΔF = F₀ - F. Samples are DNA1(○), DNA2(△), DNA3(□), DNA4(◇) and control(△).

이 GTGA와 TCAC 사이의 염기 간격을 CRP1 부위와 동일한 6개 염기들로 치환된 DNA3와 DNA4도 13개의 염기 간격을 가진 DNA2에 비해 절반 정도의 결합력을 보였다. 이 결과는 CRP2 부위에서 CRP 단백질의 결합이 consensus sequence 사이의 염기 간격에 의한 영향이 크지 않음을 보여준다. 그리고 DNA3와 DNA4가 DNA2보다 결합력이 감소하는 것은 6개의 염기 간격을 맞추기 위해서 TCAC로 치환된 염기들 중에서 오히려 CRP 단백질의 결합에 관여하는 염기가 포함된 것으로 여겨진다. 이것은 GTGA를 포함한 기존의 염기들과 CRP 사이의 상호작용이 CRP 단백질의 결합에 영향을 준 것으로 여겨진다. Gel shift assay 결과[8]에 의하면 low-salt buffer에서 CRP 단백질이 CRP2 부위보다 CRP1 부위에 우세하게 결합하지만 결합상수의 비율에서 어떻게 측정했느냐에 따라 상당한 차이를 보였다. 본 연구의 결과와 결합상수의 비율을 정확하게 비교할 수는 없지만 차이를 보이는 것은 본 연구에서 사용한 완충 용액이 100mM KCl을 포함하고 있으며, 또한 결합력을 측정할 때 gel이 아닌 용액상태에서 했으며 그리고 동일한 환경에서 각각의 CRP 농도에 대하여 3번 측정한 값들의 평균값을 사용하였다.

Fig. 3에서 T127G CRP에 의한 DNA의 결합에 관한 결과를 보여준다. 여기서 야생형 CRP와 동일한 경향을 보였으며 각각의 결합력은 DNA1이 DNA2보다 1.6배, DNA3보다 2.1배, DNA4보다 2.2배 결합이 증가하였다. 특히

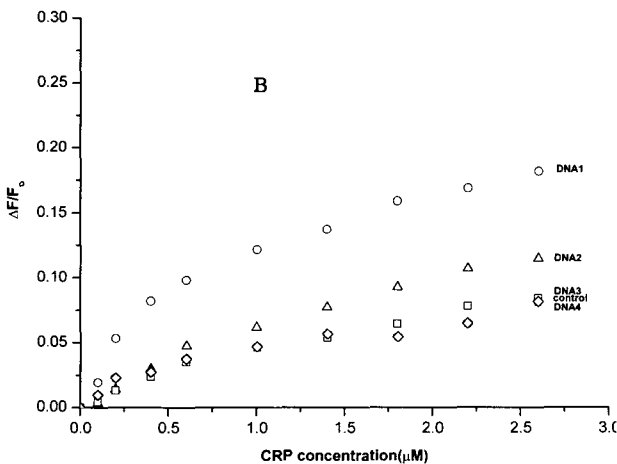


Fig. 3. The fluorescent quenching plot of T127G CRP(B). Identical to the conditions described in Fig. 2 with the exception of T127G CRP used in this reaction.

T127G CRP만 존재하는 기준 샘플(control)이 DNA3 그리고 DNA4와 거의 동일한 결합력을 갖는다. 이 결과는 기본적으로 cAMP 결합부위의 아미노산 치환이 cAMP의 결합에 의한 CRP의 활성인 형태로의 구조적인 변화가 야생형 CRP에 비해 낮다는 것을 보여준다. Lee et al[10]에 의하면 T127G CRP는 cAMP 하에서 야생형 CRP:cAMP 복합체와 유사한 구조를 갖지만 lacP를 활성화하지 못했다. 또한 Ebright et al[3]에 의하면 이런 돌연변이 CRP는 DNA에 결합하지 못하기 때문에 락토스 전사를 활성화하지 못한다고 보고했다. 그러나 본 연구의 결과에 의하면 T127G CRP가 DNA에 전혀 결합할 수 없는 것이 아니라 약한 결합이 이루어지는 것을 알 수 있다. 앞에서 언급한 야생형의 경우와 마찬가지로 GTGA와 TCAC 사이의 염기 간격이 변화되어도 결합력에는 큰 영향을 주지 않았다.

Fig. 4와 5는 두 종류의 CRP에 따라 쉽게 결합력의 차이를 볼 수 있도록 도시한 그림이다. 그림 Fig. 4(A)는 CRP1 부위에 대한 두 종류 CRP의 결합력을 보여준다. 그리고 Fig. 4(B)는 CRP2 부위에 대한 결과이다.

이 결과들을 Origin 6.0 프로그램을 이용한 non-linear regression 분석[5,7]에서 DNA1에 대한 결합력에서 야생형 CRP가 T127G CRP 보다 약 3배가 크며, 또한 DNA2에 대한 경우는 3.5배 야생형 CRP의 결합력이 큼을 보여준다. 그러나 DNA3와 DNA4의 경우는 Fig. 5에서 보듯이 큰 차이를 보이지 않았다. Weber et al에 의하면[16] CRP의 cAMP binding pocket에 cAMP 분자가 결합할 때 cAMP의 N⁶ amino group과 아미노산 127번 threonine의 O 사이의 수소결합이 이루어진다. 그러나 threonine을 glycine으로 치환된 T127G CRP는 이런 수소결합이 형성되지 못함에 따라 cAMP의 결합력을 감소시킨은 물론 활성인 형태(active conformation)로 CRP의 구조변화에 또한 영향을 준 것으로 여겨진다[13].

요약하면 야생형 CRP와 T127G CRP의 결과를 비교하여 보면 DNA3과 DNA4에서는 확실하게 나타나지는 않지만 DNA1과 DNA2에서 야생형 CRP가 T127G CRP보다 수배 높은 결합력을 나타내었다. 이 결과에서 cAMP 결합과 이에 수반되는 CRP 구조변화에 127번 아미노산인 threonine 역할을 보여주는 결과이다. 또한, CRP1 부위가 CRP2 부위보다 결합력이 훨씬 우세한 것으로 나타났다. 그리고 CRP1 부위와 동일하게 6개의 염기 간격을 맞춘 DNA3의

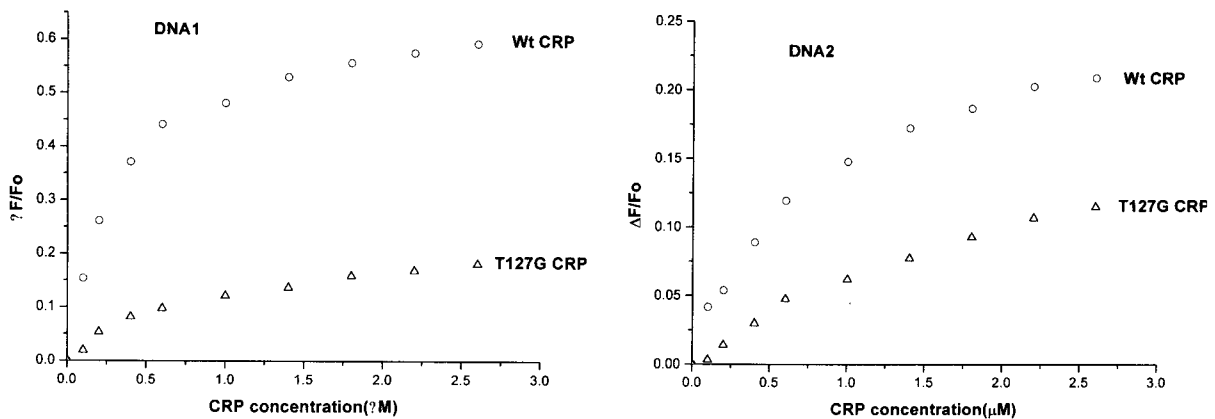


Fig. 4. The fluorescent quenching graphs of T127G and WT CRP with DNA1(left) and DNA2(right). Samples are referred to wild-type CRP(○) and T127G CRP(△).

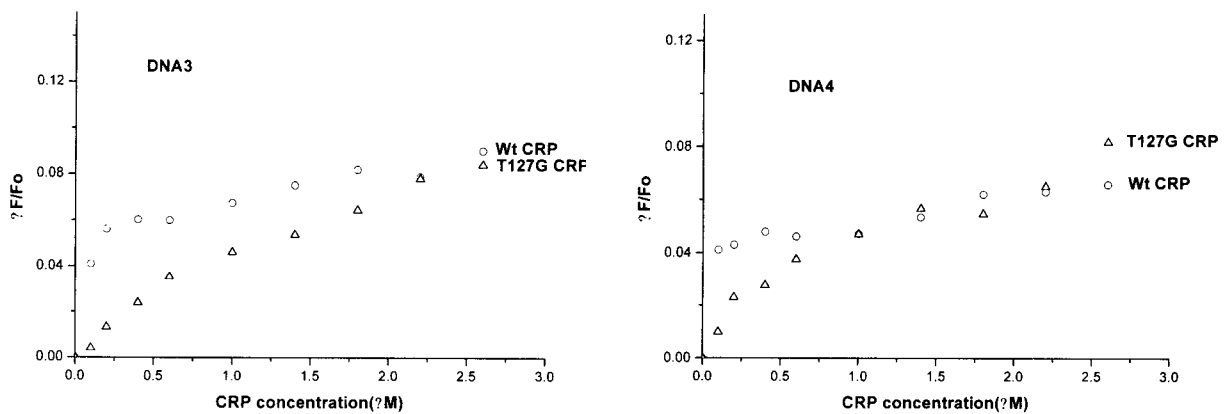


Fig. 5. The fluorescent quenching graphs of T127G and WT CRP with DNA3(left) and DNA4(right). Samples are referred to wild-type CRP(○) and T127G CRP(△).

결합력은 DNA2에 비해 절반정도의 결합력을 나타내었다. 또한 CRP2 부위의 염기서열에서 TCAC를 제거한 DNA4의 결합력 역시 DNA3과 비슷한 결과를 보여주었다. 이 결과를 통해서 알 수 있는 것은 CRP 단백질의 결합력은 GTGA와 주변 염기들에 의한 복합적인 상호작용이 결합에 영향을 주는 것으로 여겨진다.

참고 문헌

1. Belduz, A. O., E. J. Lee and J. G. Harman. 1993. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of Escherichia Coli: targeting positions of 72 and 82 of cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1827-1835.
2. Cheng, X. and J. C. Lee. 1998. Interactive and dom-

- inant effects of residues 128 and 141 on cyclic nucleotide and DNA bindings in Escherichia coli cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 705-712.
3. Ebright, R. H., Le Grice, S. F. J., Miller, J. P. and J. S. Krakow. 1985. Analogs of cyclic AMP that elicit the biochemically defined conformational change in catabolite gene activator protein(CAP) but do not stimulate binding to DNA. *J. Mol. Biol.* **182**, 91-107.
4. Harman, J. G., K. McKenney and A. Peterkofsky. 1986. Structure-function analysis of three cAMP-dependent forms of the cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 16332-16339.
5. Head, C. G., A. Tardy and L. J. Kenney. 1998. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the ompF and ompC regulatory sites. *J. Mol. Biol.* **281**, 857-870.
6. Heyduk, T. and J. C. Lee. 1989. Escherichia coli

- cAMP receptor protein evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry* **28**, 6914-6924.
7. Heyduk, T. and J. C. Lee. 1990. Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor Escherichia coli cAMP receptor protein and lac promoter interaction. *Proc.-Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 1744-1748.
 8. Hudson, J. M. and M. G. Fried. 1991. The binding of cyclic AMP receptor protein to two lactose promoter sites is not cooperative in vitro. *J. of Bacteriol.* **173**, 59-66.
 9. Kolb, A., H. Buc, S. Garges and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.
 10. Lee, E. J., J. Glasgow, S-F Leu, A. O. Beluz and J. G. Harman. 1994. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of Escherichia Coli: targeting positions of 83, 127 and 128 of cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acid Res.* **22**, 2894-2901.
 11. McKay, D. B., I. T. Weber and T. A. Steitz. 1982. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 angstrom resolution. *J. Biol. Chem.* **257**, 9518-9524.
 12. Mukhopadhyay, J., R. Sur and P. Parrack 1999. Functional roles of the cyclic AMP-dependent forms of cyclic AMP receptor protein from Escherichia coli. *FEBS Letters* **453**, 215-218.
 13. Reznikoff, W. S. 1992. Catabolite gene activator protein activation of lac transcription. *J. Bacteriol.* **174**, 655-658.
 14. Schmidt, A. 1981. Cyclic AMP receptor protein interacts with lactose operator DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 277-292.
 15. Shi, Y., S. Wang and F. P. Schwarz. 2000. Inter-subunit association induces unique allosteric dependence of the T127L CRP mutant on pH. *Biochemistry* **39**, 7300-7308.
 16. Weber, I. T. and T. A. Steitz. 1987. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP defined at 2.5 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.

(Received May 23, 2003; Accepted October 20, 2003)