

MCM promoter에서 E-box와 E2F 결합부위가 전사활성에 미치는 영향

권 현 주*

동의대학교 생명융합과학과

Received July 21, 2004 / Accepted August 23, 2004

Effect of E-box and E2F Binding Site on Transcriptional Activity in MCM Promoter. Hyun-Ju Kwon*. *Department of Life Science & Biotechnology, Dong-Eui University, Busan, 614-714, Korea* – MCM proteins are essential for eukaryotic DNA replication, playing roles in the initiation and elongation of DNA replication. MCM proteins expression is much higher in malignant tissues than normal tissues. Several reports have indicated the usefulness of MCM proteins as markers of cancer cells in histopathological diagnosis. However, the cause of enhanced expression of MCM proteins in cancer cells remain to be clarified. The purpose of this study is to examine the relative transcriptional activities of human *mcm* gene promoters in cancer and normal cells. The minimal promoter region required for transcription of a luciferase reporter gene was contained an E-box and one E2F site. In addition, luciferase activities from *mcm7* and *mcm2* promoter/luciferase gene reporter constructs were significantly increased in cancer cells at 8 times compared with normal cells. E-box and E2F binding site in the promoter of *mcm* genes are responsible for different mechanism of transcription regulation on the cellular environment.

Key words – MCM proteins, enhanced expression, transcription, E-box, E2F binding site

Minichromosome maintenance family (MCM)는 진핵생물의 DNA 복제단백질로써 DNA복제개시와 신장반응에 필수적인 역할을 담당하고 있다[1,12,13,25,27]. MCM 단백질은 MCM2-7의 6종류로 구성되어 있으며 이들은 모두 DNA-dependent ATPase motif를 가지고 있으나, 이중 MCM4, 6, 7 단백질의 hexameric complex만이 in vitro에서 DNA helicase 활성을 나타낸다는 보고가 있다[9,31]. 이는 곧 MCM4/6/7 complex가 복제 시 DNA helicase로써 작용한다는 것을 의미한다. MCM2, 3, 5의 역할에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있으나 이들 단백질은 MCM4/6/7 helicase 활성 제어에 관여하는 것으로 추정하고 있다[8,20].

MCM 단백질은 효모에서 autonomous replication sequences (ARS)활성화와 세포 분화 과정에 필수적인 역할을 담당하고 있는 단백질로 처음 동정되었다. 또한, MCM 단백질은 세포주기 중 한 사이클에서 단 한번만 DNA가 복제되도록 하는 DNA replication licensing system의 구성인자이다[3,14,15]. 이 system은 cyclin-dependent kinase (CDK)의 표적 단백질을 정확히 제어함으로써 over-replication을 방지하는 것으로 사료된다. 그 증거로 *Sacchomyces cerevisiae*의 over-replication은 CDK의 인산화 표적 단백질인 Cdc6, origin recognition complex (ORC), MCM의 제어 실패에 따른 결과라는 것이 보고되어 있다[16].

정상세포 내에서 염색체를 안정하게 유지하도록 하는 MCM 단백질은 oncogenes의 정상세포에서 암세포로의 전

이 효과를 높이기 위한 표적 단백질이 되기도 한다. 한편, 여러 가지 암세포에서 *mcm* 유전자의 과발현이 발견되었으며, 이것은 복제 개시점을 포함하는 유전자 영역의 over-replication으로 이어질 가능성이 높다[2,22]. 이와 같은 사실로 미루어 보아 MCM 단백질은 DNA 복제 조절을 담당하고 있으며, MCM의 DNA 복제 제어 실패는 세포의 암세포 화에 기여할 가능성이 높다.

mcm5, 6, 7 promoter 영역에는 전사인자인 E2F 결합부위가 복수 존재한다[18,24]. E2F 결합부위는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA polymerase α , MCM, ORC 등 DNA 복제에 관여하는 많은 유전자의 promoter 영역에서 발견된다. E2F는 6종류(E2F1-6)가 있으며 DP 단백질과 heterodimer를 형성하여 세포 주기에 따라 DNA 복제에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다[30]. E2F는 E2F 결합부위에 결합하여 전사를 활성화시키거나 억제하는 상반된 역할을 수행한다. 전사활성은 CDK에 의한 Rb protein family (pRB, p107과 p130)의 인산화에 의해 유도된다. E2F와 결합하여 전사를 억제하고 있던 Rb protein family가 G1기 후기에서 G1/S기에 걸쳐 인산화 되면서 E2F는 Rb 결합형에서 free E2F가 되고 이때부터 전사가 시작된다. *mcm* 유전자의 promoter에도 E2F 결합부위가 존재하기 때문에 G1/S기의 *mcm* mRNA의 상승에 E2F가 어떤 역할을 담당하고 있을 것으로 생각되고 있다. *mcm7* promoter에는 E2F 결합부위 이외에 Myc, Mad family의 결합부위인 E-box도 존재한다. 이 두 인자는 Max와 heterodimer를 형성하여 Myc-Max dimer는 전사 activator로써, Mad-Max, Max-Max dimer는 전사 repressor로써 작용 한다[19].

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1519, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : hjkwon@deu.ac.kr

몇몇 그룹의 면역 조직학 연구 보고에 의하면 정상세포와 비교하여 암세포 조직에서 보다 많은 양의 MCM이 발현된다는 사실이 확인되었다. 증식세포와 비교하여 malignant tissues에서 MCM 단백질이 과발현되는 이 현상은 암세포를 선별할 수 있는 indicator로써 사용 가능하다[23,26,28,29]. 하지만, 현재까지 MCM 단백질의 과발현 원인에 대해서는 명확하게 밝혀진 바 없다.

따라서 암세포에서 MCM이 과발현되는 원인에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 한다. 본 논문은 암세포에서 MCM 단백질이 과발현되는 원인의 한가지로 전사레벨의 차이에 의한 것으로 간주하고 *mcm* 유전자의 promoter 활성을 luciferase reporter system을 이용하여 정상세포와 암세포에서 비교 검토하였다. 또한 *mcm* 유전자 promoter에 존재하는 E2F 결합부위와 E-box의 역할을 규명하였으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Cells

HeLa cell은 10% calf serum이 함유되어 있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma)을 사용하여 배양하였다. 정상세포인 WI-38과 HUC-F 세포는 일본 RIKEN GenBank에서 구입하였으며 SV-40의 형질전환으로 암세포화된 GM00637과 VA-13 세포는 Coriell Cell Repositories에서 구입하였다. 이들 세포는 10% fetal calf serum이 함유된 DMEM으로 배양하였다. WI-38과 HUC-F는 33-38 정도의 population doubling level을 가지는 세포만을 실험재료로 사용하였으며 이들 세포의 증식은 대략 41 population doubling level에서 정지되었다.

PCR을 이용한 *hG3PDH* 유전자 promoter의 cloning

두 개의 다른 세포를 사용하여 *mcm* promoter의 전사활성을 비교하기 때문에 세포내 도입 효율을 일정하게 유지하기 위하여 control luciferase reporter가 필요하다. Control reporter로는 pHsG3PDH-Rluc plasmid를 제작하여 사용하였다. 이 plasmid는 pRL-null vector (Promega)에 WI-38과 HeLa세포에서 전사량이 동일한 *hG3PDH* promoter와 Renilla luciferase gene을 포함하고 있기 때문에 이 plasmid를 한 세포 내에 공동입시킴으로써 대조 표준으로 삼을 수 있다. pHsG3PDH-Rluc는 HeLa 세포의 게놈 DNA로부터 *hG3PDH* 유전자의 promoter 영역(-905에서 +55)을 cloning 하기 위하여 forward primer (*HindIII*) 5'-ctctcctagcagaagcttccc-3'와 reverse primer (*EcoRI*) 5'-cccgaattccctggcgcgcaaaagaaga-3'를 사용하여 960 bp영역을 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭시킨 후 Renilla luciferase gene을 함유하고 있는 pRL-null vector의 *HindIII*와 *EcoRI* 사이에 cloning하여 제조하였다[4].

mcm7 promoter E2F 결합부위 및 E-box 변이체 제작

*mcm7*의 full promoter (Genbank accession No. AB004270)인 A0 promoter를 luciferase gene이 함유된 pGV-B vector (Toyo Inki, Japan)에 cloning한 pMCM7A0-luc plasmid는 일본 암 연구센터의 Tohru Kiyono 박사로부터 공급 받았다 (Fig. 1). A0 promoter는 0.55 kb의 크기로 세 개의 E2F 결합부위, 세 개의 GC box, 두 개의 CCAAT box와 한 개의 E-box로 구성되어 있다. 결손변이 promoter A8은 A0 promoter로부터 전사 개시 영역에 가까운 E-box 한 개와 E2F 결합부위 한 개만 포함하는 85 bp (-139~-54) 크기의 promoter이고 A8M은 A8의 E-box와 E2F 결합부위를 변이시킨 promoter이다. A8과 A8M 역시 Tohru 박사로부터 제공 받았다.

본 연구에서는 A8 promoter 영역에 존재하는 E-box와 E2F 결합영역의 역할을 조사하기 위하여 변이체 A8ME와 A8ME2F promoter (Fig. 1B)를 각각 제작하였으며 각 변이 promoter 제작을 위해서 사용한 primer는 Table 1과 같다. A8ME와 A8ME2F는 A8 promoter에서 E-box, E2F 결합부위를 각각 변이시킨 변이 promoter이다. 변이체 제작은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)를 이용하여 제작하였다. 제작된 plasmid는 DNA sequencing을 행하여 변이를 확인하였다.

Human *mcm2* 유전자 promoter영역의 cloning

mcm2 유전자(Genbank accession No. NT-005612)의 full promoter 영역 (B0)을 cloning하기 위하여 전사개시 영역을 포함한 -1179에서 +91까지 1270 bp 부분을 Table 1에 제시한 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다(Fig. 2A). 증폭된 산물은 pGV-B vector의 *XhoI*과 *HindIII*사이에 cloning하여 pMCM2-B0-luc plasmid라 명명하였다. B0 promoter는 1.27 kb 크기로 두 개의 E-box, 세 개의 GC box, 한 개의 E2F 결합부위를 가지고 있다. *mcm2* promoter의 변이 promoter B2, B2M, B2ME2F, B2ME를 제작하기 위한 primer 역시 Table 1에 나타내었다. B2 promoter는 B0 promoter의 일부분인 -29에서 +91 사이를 함유한 promoter로 한 개의 E-box와 E2F 결합부위를 가지고 있다. B2M은 B2 promoter영역에서 E-box와 E2F 결합부위를 모두 변이시킨 promoter이고 B2ME2F와 B2ME는 B2에서 E2F 결합부위와 E-box만을 각각 변이시킨 promoter이다(Fig. 2B).

DNA sequencing

PCR 산물 및 변이 유전자의 염기배열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)를 사용하여 확인하였다.

Luciferase Reporter Assay

Promoter의 전사활성은 luciferase reporter assay로 측정하였다. Luciferase활성 측정은 각종 promoter가 함유된

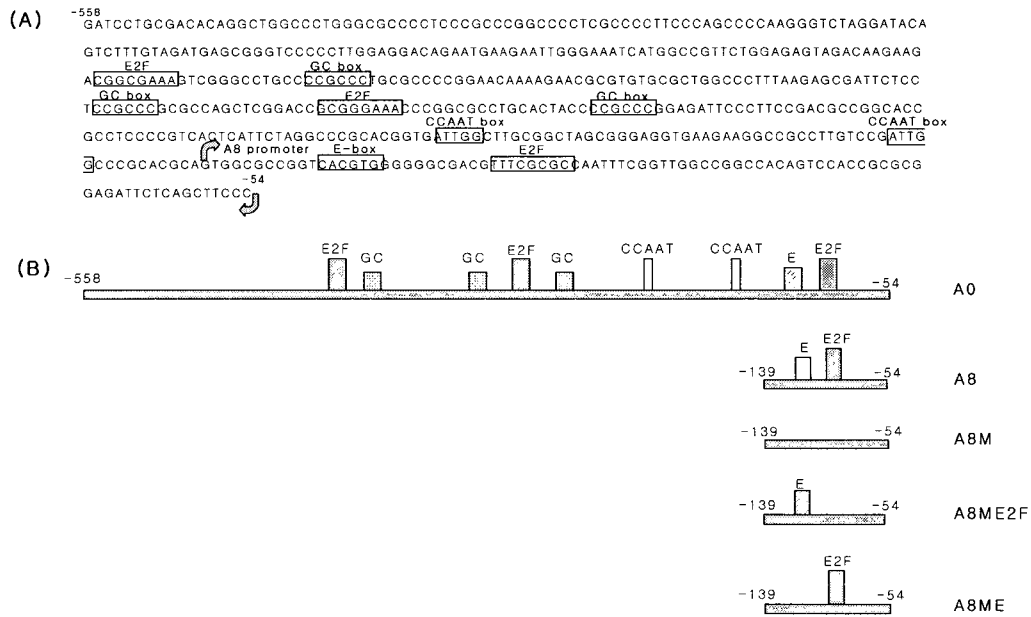


Fig. 1. Nucleotide sequence of the *mcm7* A0 promoter.

Putative transcription factor binding sites are boxed (A). Schematic representation of the primary structures of A0 promoter and its mutant promoters (B). A0: include three E2F sites, three GC boxes, two CCAAT boxes and a E-box. A8: include one E2F site and E-box, A8M: include mutated sequence for E-box and E2F sites, A8ME: include mutated sequence for E-box, A8ME2F: include mutated sequence for E2F site. Mutated sequences for E-box (AGTTTA) and E2F site (AGGTGTGT).

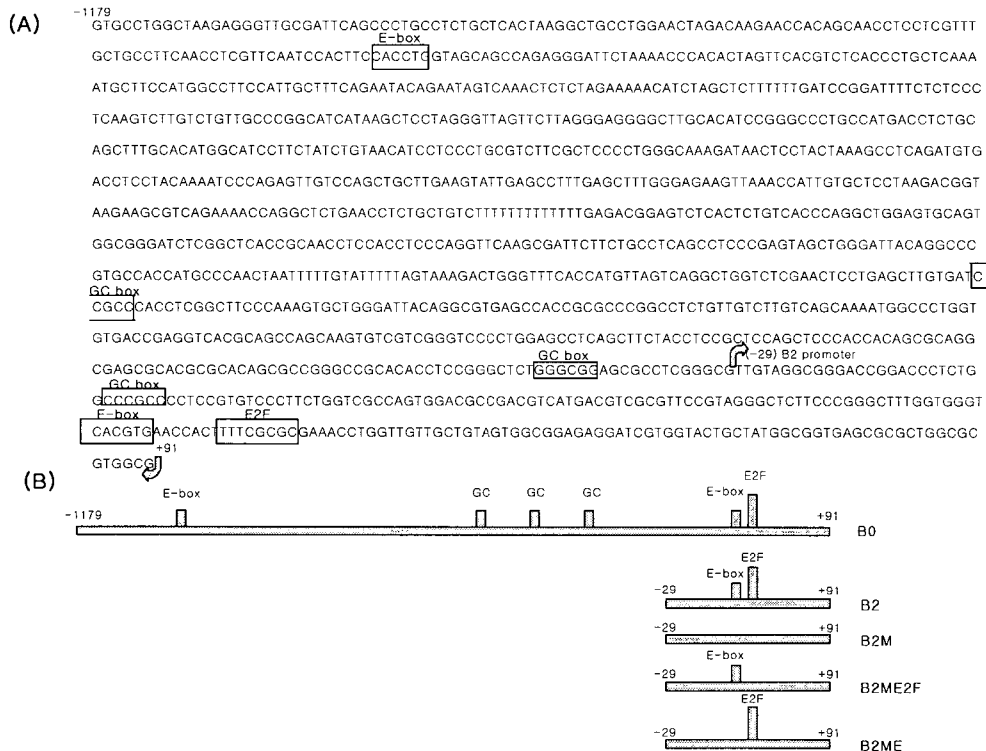


Fig. 2. Nucleotide sequence of the *mcm2* 5'-flanking region.

Putative transcription factor binding sites are boxed (A). Schematic representation of the primary structures of B0 promoter and its mutant promoters (B). B0: include one E2F site, three GC boxes, and two E-boxes. B2: include one E2F site and E-box, B2M: include mutated sequence for E-box and E2F sites. A8ME: include mutated sequence for E-box, A8ME2F: include mutated sequence for E2F site. Mutated sequences for E-box (AGTTTA) and E2F site (AGGTGTGT).

Table 1. Nucleotide sequence of the primers used for mutagenesis of *mcm* promoters

Plasmid	Cloned promoter	Oligonucleotide sequence	Characteries
pMCM7A0-luc	A0	from Dr. Tohru Kiyono	Full promoter region of <i>mcm7</i> gene
pMCM7A8-luc	A8	from Dr. Tohru Kiyono	Include one E2F site and E-box of A0 promoter
pMCM7A8M-luc	A8M	from Dr. Tohru Kiyono	Include mutated sequence for E-box and E2F site of A8 promoter
pMCM7A8ME-luc	A8ME	5'-cgcagtggcgccggtagtttagggggcgacgtttcgc-3' 5'-gcgaaactgccccctaaactaccggcgccactg-3'	Include mutated sequence for E-box of A8 promoter
pMCM7A8ME2F-luc	A8ME2F	5'-ccggtcacgtggggggcgacgagggtgtcaatttcggttgccg-3' 5'-cggccaaccgaaattgacacacctgccccccacgtgaccgg-3'	Include mutated sequence for E2F site of A8 promoter
pMCM2B0-luc	B0	5'-gggacctcgagggctaagagggttgattca-3' 5'-ggcccaagcttccagcgcgctcaccgcatag-3'	Full promoter region of <i>mcm2</i> gene
pMCM2B2-luc	B2	5'-ccggctcgagggctctcccgggctttggtg-3' 5'-ggcccaagcttccagcgcgctcaccgcatag-3'	Include one E2F site and E-box of B0 promoter
pMCM2B2ME-luc	B2ME	5'-cttggtgggtagtttaaacacttttcg-3' 5'-cgaaaagtgtttaaactaccaccaag-3'	Include mutated sequence for E-box of B2 promoter
pMCM2BME2F-luc	B2ME2F	5'-cacgtgaaccactaggtgtgaaacctggttgg-3' 5'-caacaaccaggttccacacctaggttcacgtg-3'	Include mutated sequence for E2F site of B2 promoter
pMCM2M-luc	B2M	5'-cttggtgggtagtttaaacactaggtgtgaaacctggttgg-3' 5'-acaaccaggttccacacctaggtttaaactaccaccaag-3'	Include mutated sequence for E-box and E2F site of B2 promoter

Mutated sequences for E box and E2F site are indicated as underlines.

plasmid 500 ng/ml를 LipofectAMINE 2000 (Life Technologies, Inc.)을 사용하여 각 세포에 도입시키고 약 40시간 후 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)을 사용하여 측정하였다. 세포 내 도입 효율은 10 ng/ml pHsG3PDH-Rluc를 공동입하여 측정된 Renilla luciferase 활성으로 계산하였다. 모든 실험은 적어도 각기 다른 조건 하에서 3번 이상의 측정을 거쳐 행하였다.

결 과

정상세포와 암세포에서 *mcm7* promoter 활성 비교

MCM 단백질은 세포 주기 중 S기의 복제 개시 및 DNA 신장 반응에 있어서 필수 단백질이다. 또한, licensing factor 로써 세포주기 동안 단 한번의 DNA 복제만이 이루어 질 수 있도록 조절하는 중요 단백질이다. 몇몇 연구 그룹에 의해서 암조직과 정상조직을 비교한 결과 암조직에서 MCM 단백질의 발현이 높게 나타난다고 보고되었다[23,26,28,29]. Ishimi 등[10]이 세포레벨에서 MCM 단백질 발현량 변화를 분석해 본 결과 정상세포인 WI-38과 비교하여 HeLa세포에서 5-14 배 높게 나타난다는 것을 확인하였다. 이와 같은 MCM 단백질의 발현량 변화는 전체 단백질에서나 활성형으로 간주되

는 chromatin 결합형에서 동일한 결과를 나타내었다. 또한, MCM 단백질의 안정성은 두 세포에서 비슷한 양상을 보이 나 MCM 단백질의 합성속도는 HeLa세포에서 10배 정도 높 게 나타났으며 mRNA량도 8배 이상 높게 나타났다. 따라서 암세포에서 MCM 단백질의 발현량이 증가한 것은 전사레벨 에서의 증가가 원인인 것으로 보고되고 있다[10].

전사량의 증가 원인으로는 2가지를 생각할 수 있다. 첫 번째는 chromatin의 구조적인 차이에 의한 전사량의 차이이다. 두 번째는 전사인자의 차이이다. 전사인자는 transcriptional activator와 repressor가 존재하며 이들의 활성 차이, 다른 인 자와의 co-operation 등에 따라 전사량의 차이를 가져 올 수 있다.

따라서 본 연구에서는, 전사레벨의 증가 원인을 분석하기 위하여 luciferase reporter system을 이용하여 정상세포와 암세포에서 *mcm7* promoter의 활성을 비교해 보았다. WI-38 과 HeLa세포 내의 luciferase 도입 효율과 활성을 최대한 동 일 조건 하에서 측정하기 위하여 각각 5×10^5 세포를 사용하 였고 A0, A8, A8M promoter를 각각 도입한 뒤 충분히 전사 활성을 나타내도록 40시간 배양하였다. 배양 40시간 후 Dual Luciferase Reporter Assay System에 의해 *mcm7* promoter 활성과 *hG3PDH* promoter 활성을 각각 측정하여 분석하였

다. 여기서 두 가지 결과를 얻을 수 있었다. 첫 번째, 정상세포 WI-38에 비해 HeLa 세포에서 A0 promoter는 8배, A8 promoter는 6배 높은 전사활성이 나타나 두 세포간의 promoter 활성 강도 차이를 볼 수 있었다(Fig. 3). 따라서 동일한 promoter가 다른 두 세포에서 전사활성의 차이를 보인다는 것은 각각의 세포에서 각기 다른 전사인자가 작용하여 전사를 활성화시키기 때문으로 사료되어진다. 두 번째, promoter 영역에서 전사인자 결합부위의 역할을 추정할 수 있었다. 암세포에서 *mcm7* promoter의 full 영역을 포함하고 있는 A0 promoter의 활성과 비교하여 A8 promoter는 약 50%의 활성을 유지하고 있었다. A0 promoter 영역에는 세 개의 E2F 결합부위, 세 개의 GC box, 두 개의 CCAAT box와 한 개의 E-box로 구성되어 있으며 A8은 A0 결손변이 promoter로써 E-box와 E2F 결합부위 하나씩 존재한다. A0와 A8 promoter의 활성 차이는 E-box와 E2F 결합부위 이외 다른 영역의 존재에 의해 비롯되는 것으로 생각된다. 또한, A8 promoter의 E-box와 E2F 결합부위에 변이를 일으킨 A8M promoter의 활성을 측정한 결과 A8 promoter의 활성과 비교하여 거의 활성을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 *mcm7* promoter 활성 유지에 있어서 E-box와 E2F 결합부위가 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다. 정상세포에서의 A0, A8, A8M의 활성 역시 암세포와 동일한 양상을 나타내었다(Fig. 3).

***mcm7* promoter 활성에 대한 E-box와 E2F 결합부위의 역할**

위에서 설명한 대로 각 세포내에서 A0, A8, A8M promoter의 전사 활성 차이로 E-box와 E2F 결합부위는 *mcm7*

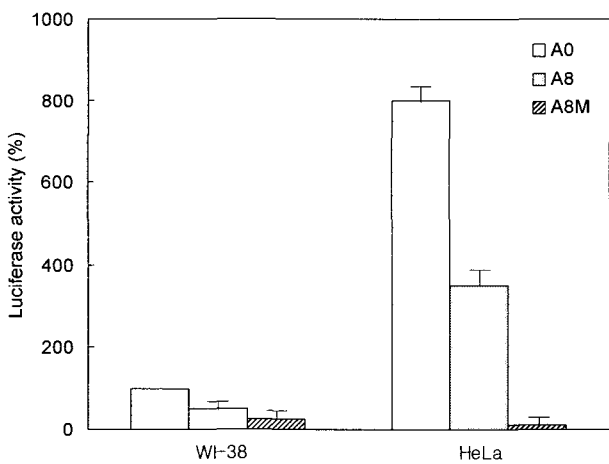


Fig. 3. Luciferase activity of A0 and its mutant promoters in HeLa and WI-38 cells. Bars represent the standard deviation calculated from three replicates. Two days after the transfection, the promoter activity was assessed as luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity expressed from the cotransfected plasmid pHsG3PDH- Rluc/pRL-null.

promoter의 전사활성에 어느 정도 관여하는 것으로 추정되었다. 이들 영역의 역할을 규명하기 위하여 E-box와 E2F 결합부위 한 개씩 존재하는 A8 promoter를 이용하여 실험 재료 및 방법에 설명한대로 변이 promoter A8ME2F와 A8ME를 제작하여 전사활성의 변화를 측정하였다. 또, *mcm7* promoter 활성이 HeLa 이외의 암세포에서도 같은 양상의 결과가 나타나는지 확인하기 위하여 GM세포와 VA-13세포도 병행하여 실험하였다(Fig. 4). GM세포는 사람 섬유아세포를

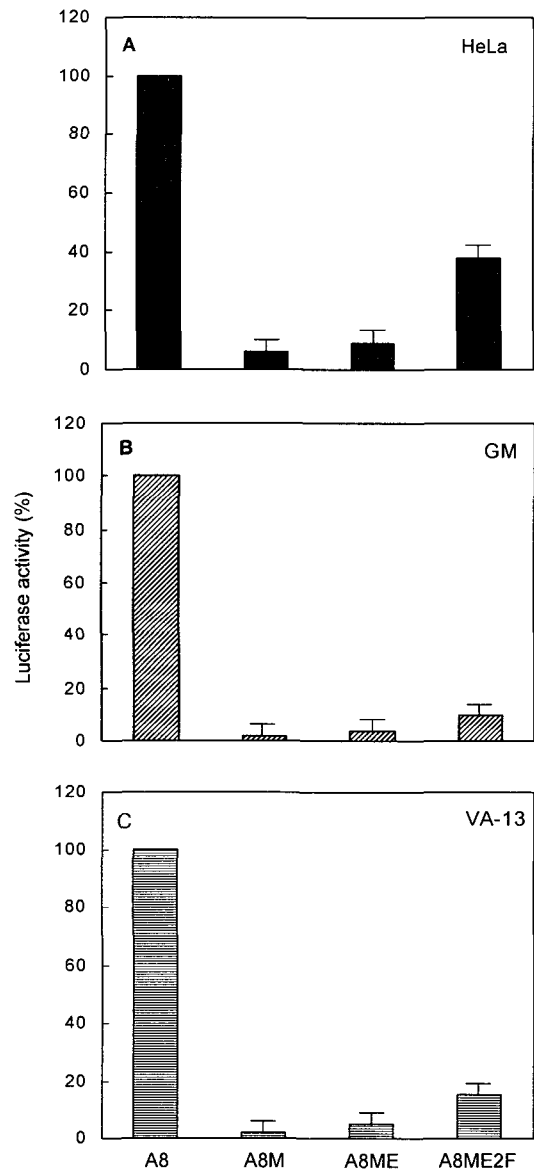


Fig. 4. Relative luciferase activity of mutant promoters of A8 in cancer cells. (A); HeLa cells, (B); GM cells, (C); VA-13 cells. A8: include one E2F site and E-box, A8M: include mutated sequence for E-box and E2F sites, A8ME: include mutated sequence for E-box, A8ME2F: include mutated sequence for E2F site.

SV40로 형질 전환하여 암세포화 한 것이고 VA-13세포는 WI-38세포를 SV40로 형질 전환하여 암세포로 전환시킨 것으로 WI-38과 비교 분석하기에 좋은 암세포이다. Fig. 4에 나타난 결과와 같이 A8M promoter의 활성은 세 종류의 암세포 모두에서 거의 활성을 나타내지 않았다. 따라서 A8 promoter 영역의 E2F 결합부위와 E-box 영역은 *mcm7* promoter의 활성에 중요한 역할을 하는 영역임을 확인하였다. 다음은 E-box의 역할을 규명하기 위하여 E-box가 변이된 A8ME promoter의 활성을 측정된 결과 활성을 나타내지 않았다. 한편, E2F 결합부위를 변이시킨 A8ME2F promoter의 활성은 HeLa의 경우 A8 promoter 활성과 비교하여 약 40%의 활성을 보였으며 GM과 VA-13에서도 각각 15%, 20%의 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 E-box와 E2F 결합 부위는 *mcm7* 전사에 중요한 역할을 하고 있으며 그 중에서도 E2F 결합부위가 더 중요한 역할을 하고 있는 것으로 나타났다.

한편 정상세포에서 이들 영역의 역할을 검토하기 위하여 정상세포 WI-38과 사람 태줄 유래의 정상 섬유아세포 HUC-F를 사용하여 암세포와 동일한 방법으로 실험하여 전사활성을 측정하였다(Fig. 5). 정상세포에서는 A8 promoter에 비해 A8M, A8ME promoter는 암세포와 마찬가지로 약 20-40%의 낮은 활성을 가지는 반면 A8ME2F promoter는 원래의 A8 promoter 활성에 비해 오히려 증가하여 약 2배의 활성을 나타내었다. *mcm7* promoter의 변이 promoter들의 활성을 비교한 결과 E2F 변이 promoter인 A8ME2F의 활성이 정상세포와 암세포에서의 크게 다른 차이를 보였다.

***mcm2* promoter 활성에 대한 E-box와 E2F 결합부위의 역할**

위의 결과에 따르면 *mcm7* A8 promoter 영역의 E-box와 E2F 결합영역은 전사활성에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 정상세포와 암세포에서 서로 다르게 작용하고 있는 것으로 사료된다. *mcm7* 이외의 다른 *mcm* 유전자의 promoter 영역에도 E2F 결합부위가 존재하나 E-box와 E2F 결합부위가 동시에 존재하는 경우는 *mcm2* 유전자의 promoter이다. 따라서 *mcm2* promoter를 정상세포와 암세포에 도입하여 E-box와 E2F 결합부위의 활성차이를 확인해 보기로 하였다. 먼저 WI-38과 HeLa세포 내에 *mcm2*의 full promoter를 함유하고 있는 plasmid pMCM2- B0-luc와 pHsG3PDH-Rluc를 공동 도입하여 이들 luciferase reporter 활성을 측정하여 보았다. 측정 결과 WI-38 세포내의 활성을 100%로 하였을 때 HeLa 세포에서는 840%의 활성을 나타내었다. *mcm7*의 A0 promoter와 마찬가지로 *mcm2*의 B0 promoter 역시 HeLa세포 내에서 정상세포보다 약 8배 정도 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 *mcm2* promoter 역시 동일 promoter가 정상세포와 암세포에서 전사 활성의 차이를 나타냄으로 *mcm2*의 전사에 작용하는 인자가 암세포와 정상세포에서 다를 수 있다는 것

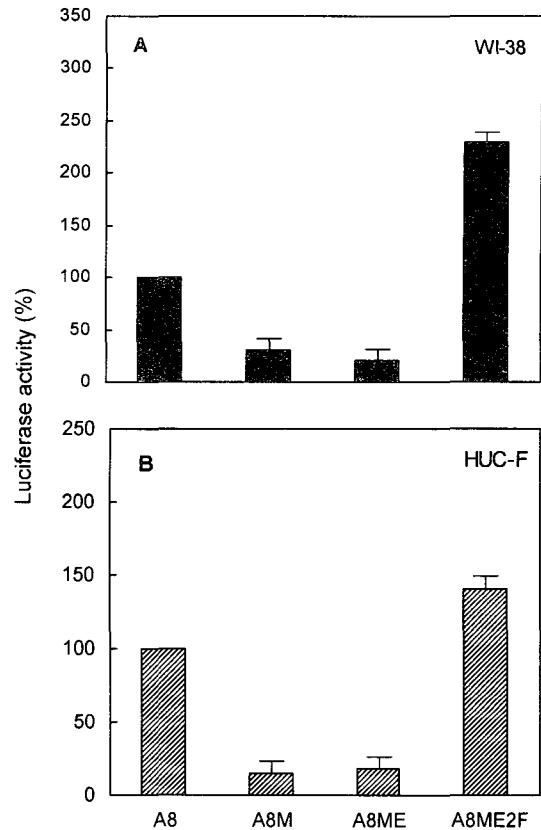


Fig. 5. Relative luciferase activity of mutant promoters of A8 in normal cells.

(A); WI-38 cells, (B); HUC-F cells. A8: include one E2F site and E-box, A8M: include mutated sequence for E-box and E2F sites, A8ME: include mutated sequence for E-box, A8ME2F: include mutated sequence for E2F site.

을 의미한다. 실제로 B0 promoter에는 A0 promoter와 마찬가지로 전사인자와 관련 있는 두 개의 E-box, 세 개의 GC box, 한 개의 E2F 결합부위가 존재한다(Fig. 2). 따라서 *mcm2* promoter의 E-box와 E2F 결합부위의 역할을 검토하기 위하여 full promoter B0와 변이 promoter B2, B2M, B2ME2F, B2ME를 HeLa세포에 도입하여 활성을 측정하여 보았다. B2는 full promoter B0에 비해 약 40%의 활성을 유지하고 있었다(data not shown). B2로부터 제작되어진 여러 변이 promoter의 활성을 측정된 결과 B2ME2F는 B2에 비해 약 25%의 활성을 유지하였으며 B2M과 B2ME는 거의 활성을 나타내지 않았다. 정상세포에서의 여러 *mcm2* 변이 promoter의 활성을 측정해 본 결과 *mcm7* 변이 promoter의 활성과 같은 양상으로 나타났으며 E2F 변이 promoter의 활성이 기존 promoter 보다 높은 활성을 유지하고 있었다(Table 2).

이상의 결과를 토대로 *mcm2* 유전자의 전사에는 *mcm7* promoter와 마찬가지로 promoter상의 E-box와 E2F 결합부위가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 이들 전사인자 결합부위에 작용하는 전사인자가 각각의 세포환경에 따라

Table 2. Relative luciferase activity of mutant promoters of B0 promoter in WI-38 and HeLa cells

promoter	cells	
	WI-38	HeLa
B2	100	260
B2M	50	26
B2ME	46	18.2
B2ME2F	110	65

다르게 작용한다는 것을 시사하였다. 하지만 이들 영역에 작용하는 전사인자가 어떤 인자인지에 대해서는 아직 더 많은 연구가 필요하다.

고 찰

Luciferase reporter system을 이용하여 여러 가지 변이 *mcm* promoter 활성을 정상세포와 암세포에서 비교한 결과 promoter 영역 중 E-box와 E2F 결합인자가 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있었다.

현재 까지 알려진 바에 의하면 HeLa 세포에서 E2F 전사인자에 의해서 조절 받는 유전자들은 human papilloma E7 oncogene 생산물이 과산화된 Rb에 결합함으로써 Rb/E2F 복합체를 불안정화 시키는 것으로 밝혀져 있다. 불안정한 Rb/E2F complex에서 유리되어 나온 free E2F의 존재량이 증가하고 그 결과 E2F 전사인자에 의해 조절 받는 유전자의 전사량이 증가하는 것이다[6]. E2F에 의해 조절받는 유전자는 MCM, DNA polymerase, CDK, E2F, DNA polymerase의 신장반응 시 필수 단백질인 PCNA 등이 보고되어 있다. HeLa 세포 내에서 단순히 E7 oncogene의 영향에 의해서 E2F 조절 유전자의 전사량이 증가하는 것이라면 MCM 이외의 다른 단백질 또한 정상세포와 비교하여 발현량에 차이가 있을 것이다. 하지만 PCNA의 발현량을 정상세포와 비교하면 두 세포간에 뚜렷한 차이를 발견하지 못하였다[10]. 따라서 MCM과 같이 정상세포와 암세포에서 두드러지게 발현량의 차이가 나타나는 것은 특징적인 인자의 존재에 의해 전사량이 증가하는 것으로 추정해 볼 수 있다.

E2F 전사인자는 E2F 1-6까지 존재하며 이중에 E2F 1-3은 activator로써, E2F 4-5는 repressor의 역할을 담당한다. E2F6은 다른 E2F인자의 활성을 조절하는 역할을 가지고 있으며 Mga-Max complex 등과 상호 작용하는 것으로 밝혀져 E2F 결합부위 뿐만 아니라 Myc 결합부위(E-box)에 결합하여 chromatin의 변화를 유도시켜 발현을 제어하며 세포주기를 G0로의 진행을 유도한다고 보고 되어있다[17]. 암세포는 정상세포와 달리 무한증식하는 특징을 가지고 있으며 E2F6 전사인자를 가지고 있으나 이들 암세포는 G0기로 진행되지 않는다. 따라서 동일한 전사인자가 각기 다른 세포내에 존재한다 하더라도 이들의 역할은 또 다른 인자들에 의해 서로 다

르게 작용한다는 것을 알 수 있다.

E-box에 결합하는 전사인자도 마찬가지로이다. Jason 등은 neuroblastoma에 있어 MCM7 단백질의 발현증가에 직접적인 역할을 담당하는 것이 Myc-N이라는 transactivator의 존재에 대해 보고하였다[11]. Myc-N은 proto-oncogene인 Myc 단백질 중 한 종류로 E-box promoter element에 결합하는 transactivator로써 Max와 heterodimer를 형성한다. Myc/Max 이외에 E-box에 결합력을 나타내는 단백질은 Max/Max, Mad1/Max complex와 upstream stimulatory factor 등이다[21]. Max 단백질은 DNA 결합 motif를 가지고 있어 DNA 결합 분자에 속하며 Myc/Max/Mad 형성에 중심적인 역할을 담당한다. 또한 Mad 단백질은 전사를 억제하거나 원만한 세포주기가 진행되도록 하는 tumor suppressor로 알려져 있다. 각기 다른 활성을 가지고 있는 이들 complex는 E-box에 결합할 수 있으나 세포주기의 진행상태 또는 다른 세포 환경에 따라 결합 형태가 다르다. 게다가 Myc의 활성과 Max에 대한 상호작용에 작용하는 다른 조절 분자들도 풍부하게 존재하여 Myc의 조직특이성과 Myc에 의해 조절되는 유전자에 따라 서로 다른 작용으로 기여한다[7].

본 연구 결과에 따르면 같은 promoter 영역이라 하더라도 정상세포와 암세포에서의 활성은 매우 다르게 나타났다. 정상세포의 경우 E-box와 E2F 결합부위에 작용하는 전사인자가 서로 상반되는 활성을 가지면서 전사활성을 정상 level로 유지하도록 하는 것으로 보인다. 그러나 정상세포의 경우에는 E2F 결합부위의 변이로 인해 repressor 혹은 regulator로 작용하는 전사인자의 결합을 유도하지 못하고 E-box에 결합하는 activator의 활성이 강하게 발휘되어 A8ME2F나 B2ME2F의 활성은 A8, B2 promoter 활성을 증가하는 것으로 사료된다(Fig. 5, Table 2).

암세포의 경우에는 E-box와 E2F 결합부위에 작용하는 인자가 정상세포와 다를 가능성이 높다. E2F 결합부위에 작용하는 전사인자는 E-box에 결합하는 전사인자의 존재에 의해 활성이 증가되는 것으로 생각된다(Fig. 4, Table 2). 따라서 E-box 결합 전사인자가 암세포 특유의 단백질로써 전사활성의 switch-on 역할을 담당하고 있을 가능성이 높다.

MCM 단백질은 복제 필수 단백질이지만 암세포에서는 정상세포와 비교하여 10배 이상의 높은 발현량을 나타낸다. 직접적인 전사인자의 동정에 대해 더 많은 연구가 진행되어야 하지만 본 연구결과로 정상세포에서는 promoter의 down regulation 활성이 강한 반면, 암세포에서는 *mcm* 유전자 promoter 활성을 증가시키는 특유 단백질의 존재가 시사되었다.

요 약

MCM 단백질의 암세포내에서 과발현 되는 원인을 규명하기 위하여 *mcm7*, 2 promoter 영역의 전사인자 결합 부위의

역할을 조사하였다. 암세포에서 promoter 활성은 정상세포보다 8배 정도 높은 활성을 나타내 특유 전사인자의 존재를 시사하였다. Promoter 영역에는 E2F 결합부위와 Myc/Max/Mad 단백질 결합 부위로 알려진 E-box가 존재한다. 이들 각각의 변이체 promoter를 작성하여 암세포와 정상세포에서 luciferase reporter 활성을 측정하는 것으로 각 영역의 역할을 검토하였다. 그 결과 정상세포 내에서는 강한 repressor 존재 또는 활성을 negative로 조절 할 수 있는 complex의 존재로 promoter 활성이 조절되는 반면 암세포 내에서는 E-box에 결합하여 promoter를 활성화시키는 특유 단백질의 존재가 시사되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발사업 중 자생식물이용기술개발사업(M103KD010023-04K0401-02310)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다. 일본 미쯔비시 화학생명연구소의 Ishimi Yukio 박사님과 암 연구센터의 Tohru Kiyono 박사님께 plasmid 공급 및 조언에 대해 감사드립니다.

참고 문헌

- Bell, S. P. and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333-374.
- Brodeur, G. M. and M. D. Hogarty. 1998. Gene amplification in human cancers: biological and clinical significance. In *The Genetic Basis of Human Cancer* (Vogelstein, B. & Kinzler, K.W., eds). pp. 161-172. McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Chong, J. P., H. M. Mahbubani, C. Y. Khoo and J. J. Blow. 1995. Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* **375**, 418-421.
- Ercolani, L., B. Florence, M. Denaro and M. Alexander. 1988. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 15335-15341.
- Freeman, A., L. S. Morris, A. D. Mills, K. Stoeber, R. A. Laskey, G. H. Williams and N. Coleman. 1999. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2121-2132.
- Goodwin, E. C. and D. DiMaio. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12513-12518.
- O'Hagan, R. C., N. Schreiber-Agus, K. Chen, G. David, J. A. Engelman, R. Schwab, L. Alland, C. Thomson, D. R. Ronning, J. C. Sacchettini, P. Meltzer and R. A. Depinho. 2000. Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat. Genet.* **24**, 113-119.
- Ishimi, Y., Y. Komamura, Z. You and H. Kimura. 1998. Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 8369-8375.
- Ishimi, Y. 1997. A DNA helicase activity is associated with an MCM4,-6, and -7 protein complex. *J. Biol. Chem.* **272**, 24508-24513.
- Ishimi, Y., I. Okayasu, C. Kato, H. J. Kwon, H. Kimura, K. Yamada and S. Y. Song. 2003. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1089-1101.
- Shohet, J. M., M. J. Hicks, S. E. Plon, S. M. Burlingame, S. Stuart, S. Y. Chen, M. K. Brenner and J. G. Nuchtern. 2002. Minichromosome maintenance protein MCM7 is a direct target of the MYCN transcription factor in neuroblastoma. *Cancer Res.* **62**, 1123-1128.
- Kearsey, S. E. and K. Labib. 1998. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta.* **1398**, 113-136.
- Kelly, T. J. and G. W. Brown. 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 829-880.
- Kubota, Y., S. Mimura, S. I. Nishimoto, H. Takisawa and H. Nojima. 1995. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of Xenopus DNA replication licensing factor. *Cell* **81**, 601-609.
- Madine, M. A., C. Y. Khoo, A. D. Mills and R. A. Laskey. 1995. MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. *Nature* **375**, 421-425.
- Nguyen, V. Q., C. Co and J. J. Li. 2001. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanism. *Nature* **411**, 1068-1073.
- Ogawa, H., K. Ishiguro, S. Gaubatz, D. M. Livingston and Y. Nakatani. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136.
- Ohtani, K., R. Iwanaga, M. Nakamura, M. Ikeda, N. Yabuta, H. Tsuruga & H. Nojima. 1999. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* **18**, 2299-2309.
- Ryan, K. M. and G. D. Birnie. 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* **314**, 713-721.
- Sato, M., T. Gotow, Z. You, Y. Komamura-Kohno, Y. Uchiyama, N. Yabuta, H. Nojima and Y. Ishimi. 2000. Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the MCM4,6,7 complex. *J. Mol. Biol.* **300**, 421-431.
- Sommer, A., K. Bousset, E. Kremmer, M. Austen and B. Luscher. 1998. Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **273**, 6632-6642.
- Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto and G. M. Wahl. 1989. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* **57**, 901-908.
- Stoeber, K., I. Halsall, A. Freeman, R. Swinn, A. Doble, L.

- Morris, N. Coleman, N. Bullock, R. A. Laskey, C. N. Hales and G. H. Williams. 1999. Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet* **354**, 1524-1525.
24. Suzuki, S., A. Adachi, A. Hiraiwa, M. Ohashi, M. Ishibashi and T. Kiyono, 1998. Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene* **216**, 85-91.
25. Tanaka, T., D. Knapp and K. Nasmyth. 1997. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell* **90**, 649-660.
26. Todorov, I. T., B. A. Werness, H. Q. Wang, L. N. Buddharaju, P. D. Todorava, H. K. Slocum, J. S. Brooks and J. A. Huberman. 1998. HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab. Invest.* **78**, 73-78.
27. Tye, B. K. 1999. MCM proteins in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 649-686.
28. Wharton, S. B., K. K. Chan, J. R. Anderson, K. Stoeber and G. H. Williams. 2001. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **27**, 305-313.
29. Williams, G. H., P. Romanowski, L. Morris, M. Madine, A. D. Mills, K. Stoeber, J. Marr, R. A. Laskey and N. Coleman. 1998. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14932-14937.
30. Yamaguchi, M., Y. Hayashi and A. Matsukage. 1995. Essential role of E2F recognition sites in regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene promoter during *Drosophila* development. *J. Biol. Chem.* **270**, 25159-25165.
31. You, Z., Y. Komamura and Y. Ishimi. 1999. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-Mcm7 DNA helicase activity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8003-8015.