

## 염기서열 특이적 전사종결부위에서 T7 RNA 중합효소 전사연장복합체 특성에 관한 연구

신지영, 이상수

배재대학교 생명공학과, 바이오의약연구센터

### Characterization of T7 RNA Polymerase Transcription Elongation Complex in Sequence-specific Transcription Termination

Ji Young Shin, Sang Soo Lee

Department of Life Science and Technology

박테리오파이지 T7 RNA 중합효소는 다른 RNA 중합효소와 비교하여 불 때 보조인자 없이 전사를 진행하는 하나의 subunit로 구성된 RNA 중합효소이다. 전사 진행 단계 중에서 T7 RNA 중합효소의 전사연장을 연구하기 위해 biotin이 결합된 DNA 주형을 streptavidin bead로 고정시킴으로서 T7 RNA 중합효소의 진행과정을 관찰할 수 있었고, 이러한 기작을 이용하여 일련의 활성을 가지는 안정한 전사연장복합체들을 얻을 수 있었다. 전사 연장체들은 16번 염기 위치로부터 18번 염기의 위치까지 방사선 동위원소가 표지되어 있으며 이들 표지된 전사연장복합체들은 단계별로 합성하여 22-40개의 핵산잔기들이 합성된 전사연장복합체들을 얻을 수 있었다. 이와 같은 전사연장복합체들을 PTH 전사종결 부위가 있는 주형으로 사용하여 야생형 및 R173C 돌연변이 RNA 중합효소를 이용하여 전사연장복합체를 제조하여 비교한 결과 PTH 전사종결에 둔감한 R173C 돌연변이 중합효소의 경우 야생형에 비해 PTH 전사종결부위를 지난 위치에서도 전사연장복합체가 생성되었다.

T7 RNA polymerase is a single subunit RNA polymerase able to accomplish whole transcription process without auxiliary factors. In order to study transcription elongation mechanism of phage T7 RNA polymerase, stepwise walking of RNA polymerase was established by immobilizing biotinylated DNA template with streptavidin bead, series of active and stable elongation complexes

were obtained. Transcripts were radio isotope labeled at the 16th, 17th and 18th nucleotide residues so stable elongation transcription complex of T7 RNA polymerase containing 22-40 nucleotide residues could be identified. We identified the positions of stably formed transcription elongation complexes of termination site in intrinsic hairpin-independent PTH terminator sequence through the established stepwise walking of wild-type or mutant R173C T7 RNA polymerases. The results suggest that stable elongation transcription complexes were made at the site of passing PTH terminator signal by mutant R173C RNA polymerase.

## 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 *et al.*, 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 만들어지면서 끝난다. *E.coli* RNA 중합효소의 경우, 이 개시단계에서는 sigma인자가 관여하나 T7 RNA 중합효소의 경우는 다른 인자 없이 진행된다. 전사개시단계 이후에, 전사연장단계에서 RNA 중합효소는 주형을 따라 계속 이동하며 RNA도 동시에 계속 생성된다 (Ikeda and Richardson, 1986). 전사연장단계에서는 전사개시단계에서보다 DNA-RNA-RNA 중합효소 복합체가 안정화되며 이때에는 매우 빠른 속도로 RNA 중합효소가 RNA분자들을 합성해 나가게 된다. 일반적으로 전사연장단계에는 크게 2가지의 모델이 제시되고 있다. 첫째의 Bubble 모델에서는 주형 DNA의 전사 촉진제 쪽에 RNA 중합효소가 결합하면서 RNA 중합효소가 DNA에 bubble 모양의 틈을 만들고 이 부위에서 중합효소가 RNA분자들을 합성한다. 둘째의 모델은 inchworm-like 모델이고, 이는 마치 전사연장단계의 RNA 중합효소가 DNA를 벌레가 기어 가듯이 전사연장을 한다고 하여 붙여졌으며, inchworm처럼 물결치듯 전진하면서 RNA는 RNA 중합효소의 loose binding site에서 합성이 되어 나온다. 마지막으로 전사종결단계가

존재하는데, 전사종결부위에서 RNA중합효소와 DNA 그리고 RNA의 복합체가 분리되고, 전사과정이 끝난다 (Chamberlin, 1994; Crok *et al.*, 1992).

T7 RNA 중합효소는 intrinsic termination signal은 hairpin-dependent termination과 independent termination으로 구분된다 (Macdonald *et al.*, 1994; Macdonald *et al.*, 1993). T7 genome의 late region에 위치한 T $\Phi$ 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 논문에서는 T7 RNA 중합효소의 전사연장 과정의 기작을 연구하기 위하여 전사연장 단계에서 한 단계, 또 다음 한 단계의 전사연장 과정의 고정된 전사연장 복합체를 얻는 시스템을 확립하였다. 특히 hairpin-independent termination signal 부위에서의 전사연장 복합체를 얻어 전사연장에서 전사종결로 이어지는 과정의 변화를 관찰하고자 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 T7 RNA 중합효소 돌연변이들은 F. W. Studier (Brook National Lab) 으로부터 받았다. 전사연장복합체를 만들기 위한 플라스미드 pUWH와 pUPTH는 Kang, C. (한국과학기술원 생명과학과)로부터 받았고, pUPTH로부터 pUCJ를 다시 클로닝 하였다.

4-Thiouridine-5'-Triphosphate (4-S-UTP)는 TriLink Biotechnologies, Inc로부터 구입하였다. 방사선 동위원소 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] rUTP (400Ci/mmol)는 Amersham phamasha 로부터 구입하

였고, Streptavidin bead는 Dynal MPC. Ltd에서 구입하였다. RNase inhibitor는 Promega Biotec로부터 구입하였고, 야생형 및 돌연변이 T7 RNA 중합효소는 phospho-cellulose column chromatography를 이용하여 정제하였다 (Shin, J. Y, 2002).

### 전사연장복합체를 만들기 위한 주형 제조

전사연장복합체를 만들기 위해서는 우선 전사 종결부위가 삽입된 플라스미드들을 PCR 방법을 통해 특정 부분만을 증폭시켰다. pUC 벡터에 삽입된 T7 전사 촉진제와 각각의 전사종결부위가 있는 DNA를 증폭시키기 위해서 pUC/M13 Forward primer와 Reverse primer를 사용하였다. Forward primer의 5'쪽에는 biotin을 labeling시켜서 증폭하였다. PCR을 수행하여 우리가 원하는 size의 DNA를 얻을 수 있었고, 이 PCR 생성물을 streptavidin bead에 고정시켜 전사연장복합체를 얻는 실험을 수행하였다.

#### Forward

5' -Biotin GTAAAACGACGGCCAGT - 3'

#### Reverse

5' - AGCGGATAACAATTTCCACACA - 3'

### T7 RNA 중합효소의 전사연장복합체 제조

T7 RNA 중합효소의 전사 연장 기작을 알아보기 위해 PCR 생성물을 streptavidin bead에 고정시킨 것을 주형으로 하였다 (그림 1). 처음에는 1X transcription buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl)로 3번 bead를 씻어 주었고, 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 5분 동안 반응하였다. 그리고 1X transcription buffer에 0.5 mM GTP와 0.5 mM ATP 그리고 0.05 mM CTP Mix 4  $\mu$ l를 넣어주고 RNasin을  $\mu$ 당 5 unit 정도 넣어서 약 20분간 반응하였다. 그리고 1X transcription buffer로 3번 wash 하였고,  $\alpha$ -p32 UTP를 최종농도 0.33  $\mu$ M로 맞추어 넣어준 후 2분 동안 실온에서 반응하였다. 그리고 1X buffer로 3번 씻은 후 각각의 해당 염기 서열마다 0.05  $\mu$ M의 GTP Mix나 CTP, UTP, ATP solution을 첨가하여 약 2분 동안 반응하였다. 전사종결부위에서 T7 RNA 중합효소와 RNA 전사연장 복합체를 보기 위해서 uridine의 광활성물질인 4-thio-UTP를

사용하였다. 각각의 반응 샘플들은 약 5  $\mu$ l dispense하여 stop solution(12 M Urea, 10 mM EDTA, 0.05% Bpb) 10  $\mu$ l를 넣어주어 종결시킨 후 ice에서 보관한 후 72°C에서 2 분간 열을 가한 후 8M urea 10% polyacrylamide denaturation gel에 5  $\mu$ l씩 loading 하여 전기영동 하였다. 전사연장복합체 전사 band의 방사능 동위원소는 Fugi phosphoimage analyzer Bas-1800을 이용하여 측정하였다. T7 RNA 중합효소의 전사 종결 과정을 확인하기 위하여 streptavidin bead로 고정시킨 주형 플라스미드를 위의 방법과 같은 방법으로 stepwise walking하였다. stepwise walking할 플라스미드에 따라 각각 반응되는 rNTP의 종류나 조합은 해당 sequence에 알맞게 제조하여 사용하였다 (그림 3).

### 전사연장복합체의 photo-crosslinking

각각의 전사복합체 10  $\mu$ l는 1.5 ml tube에 넣고, ice에 두었다. 그리고, 360 nm 램프에서 20분 동안 UV로 조사한 후 각각의 샘플은 8% SDS-PAGE gel에 걸어 Fugi phosphoimage analyzer Bas-1800을 이용하여 확인하였다.

## III. 결과 및 논의

### 전사종결부위에서 전사연장복합체의 stepwise walking

전사종결부위에서 전사연장 복합체의 산물을 stepwise walking을 통해 얻기 위해, streptavidin-biotin binding system을 사용하였다. Biotinylated template PCR product는 streptavidin-coated magnetic bead에 부착하고 각각의 ribonucleotide step에서 Danal MPC에 의해 reaction mixture로부터 분리하였다. 각각의 sequence는 전사 시작단계 앞에 T7 전사촉진제가 삽입이 되어 있고, 바로 그 뒤에 전사 시작점이 존재하며, 전사 시작점으로부터 약 15개의 핵산 잔기들이 합성되는 동안에는 DNA의 염기서열을 기준으로 thymine을 제외한 rNTP들이 합성이 되게끔 DNA 주형을 제작하였다. 그 이유는 약 2~9까지 abortive cycling을 피하기 위해서이며 15mer까지 안정적으로 전사산물을 합성하였고 (TEC15), 16~18mer 사이의 T부분들은 P<sup>32</sup>-UTP로 표지 하였다(TEC18). 그리고 22mer부터의 전사 연장 복합체들은 각각 낮은 농도(0.5 $\mu$ M)의 rNTP solution 상에서 안정적인 전사 연장 복합체를 형성하였다 (그림1).

그림 1. T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 제조. Bead에 결합된 전사주형을 이용하여 각 단계별로 TEC(전사연장 복합체)15, 18, 25, 31, 41, 46, 53, 54, 55를 만들었다. 방사성동위원소  $P^{32}$ 는 TEC15에서 삽입하였고, Thio-UTP는 TEC54에서 삽입하였다.

### Sequence 특이적 전사 종결부위인 PTH 종결부위에서의 전사연장복합체

PTH 전사종결 부위는 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 (He *et al.*, 1998; Hartvig and Christiansen, 1996; Kwon and Kang, 1999; Lyakhov *et al.*, 1998; Mead *et al.*, 1986).

PTH 전사종결 부위에 야생형 RNA 중합효소로 walking 하였을 때는 TEC62번까지 전사가 진행되고 그 다음 step의 TEC63에서는 더 이상 전사가 진행되지 않았다 (그림

2-A). TEC62는 TEC58에서부터 계속해서 U가 합성되는 부분이기 때문에 TEC58에서 TEC62는 사이의 어느 부분에서 종결되는지는 알 수 없다. 이 부분은 전사종결의 ATCTGTT 염기 서열의 뒷부분으로 'ATCTGTT' 서열이 나오면 전사가 종결되는 것을 확인 하였다. PTH 전사종결 부위에 R173C T7 RNA 중합효소로 walking 하였을 때, TEC65번까지 전사가 진행되는 것을 확인하였고 ATCTGTT 서열 부분이 지나도 전사 종결 되지 않고 계속해서 68mer 까지 전사가 연장되는 것을 확인하였다 (그림 2-B).

Conserved된 upstream termination module (TEC55)에 rUTP대신photo-reactive 4-thio-UTP를 합성한 후 TEC54부터 TEC65번까지의 transcription complex에 360 nm의 UV를 쬐었다. photo-crosslink product는 4-thio-UTP 때문이며, cross-link는 photo-reactive 4-thio- UTP를 합성하여 RNA와 RNA중합효소가 상호작용하고 있음을 보여준다. TEC55, TEC56, TEC57, TEC58, TEC62에서 야생형 T7 RNA중합효소는 55-sU와 cross-link함을 보았고 이는 RNA 중합효소와 RNA의 상호작용이 이 들 전사연장 복합체에서 일어남을 의미한다. 이것은 전사종결 될 때 RNA와 RNA중합효소가 약 8 bp에서 상호작용하고 있음을 알 수 있다 (그림 3-B).

반면 돌연변이 PTH 전사종결 부위에 둔감한 R173C T7 RNA 중합효소의 경우 (Lyakhov, 1997; Zahang and Studier, 1995) RNA-RNA중합효소 상호작용을 알아보기 위해 TEC55에 4-thio- UTP를 합성하여 photo-crosslinking한 결과 TEC55, TEC56, TEC57, TEC58, TEC62, TEC63에서 R173C T7 RNA중합효소가 55-sU와 cross-link하는 것을 확인 하였다. 이것은 전사종결 될 때 RNA와 RNA중합효소가 약 9 bp에서 상호작용하고 있음을 알 수 있다 (그림 4-B).이것은 야생형 T7 RNA 중합효소와 비교해 볼 때 야생형보다 R173C에서 더 많은 RNA부위와 상호작용하고 있으며 이것은 전사가 종결되거나 전사가 진행될 때 RNA중합효소의 구조적인 변화에 의함이라고 생각 된다 (그림 4).

PTH전사종결부위는 전사 종결이 되기 이전에는 안정적으로 전사연장복합체의 합성이 이루어 졌으나, 'ATCTGTT'염기서열이 나오면 전사가 종결이 일어나는 것을 전사연장 복합체 형성을 통하여 알 수 있었으며 R173C돌연변이는 전사가 종결되지 않았고 계속해서 전사가 진행되었다. 이것은 R173C RNA 중합효소가 구조적인 변화에 의해서 전사종결 부위를 인식하지 못하는 것으로 생각되어진다. PTH전사종결부위에서 wild RNA 중합효소와 R173C mutant RNA 중합효소의 전사연장복합체의 특성을 알아보기 위하여 전사종결부위에 rUTP대신 4-thio-UTP를 합성하고 UV로 crosslinking된 것에서는 wild에서보다 R173C에서 더 길게 RNA와 RNA중합효소가 서로 상호작용하고 있었는데 이것은 전사종결 될 때와 전사가 진행 될 때의 RNA중합효소의 구조적 변화

에 의한 것으로 생각되어진다. 생체의 T7 RNA 중합효소는 trypsin에 의해 179번 아미노산인 lysine이 잘려져 N-terminal쪽 20 kDa와 C-terminal쪽 78kDa로 나뉘어 진다고 보고 되었다. 전사종결부위에서 T7 RNA 중합효소의 RNA binding site를 mapping하기 위해 crosslinking된 전사연장복합체를 trypsin처리하여 C-terminal 쪽에 RNA중합효소의 활성부위가 있음을 확인하였다 (Data not shown). 앞으로 전사종결 부위의 전사 진행에서 RNA와 상호작용 하는 RNA중합효소 활성부위의 위치와 구조변화에 대한 더 많은 연구가 수반되어야 할 것이다.

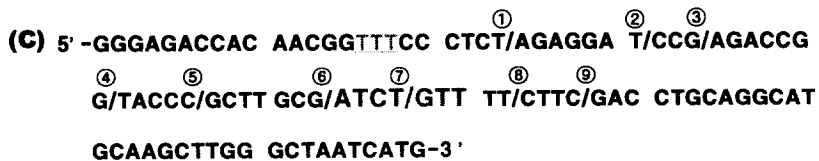


그림 2. PTH 전사종결 부위의 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 합성. (A) 야생형 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 생성물, (B) R173C 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 생성물, (C) 전사 주형으로 사용된 PTH 전사종결 부위의 DNA 염기서열, ①-⑨ ; 전사 주형에서의 전사 진행된 전사연장 복합체의 위치를 표시함.



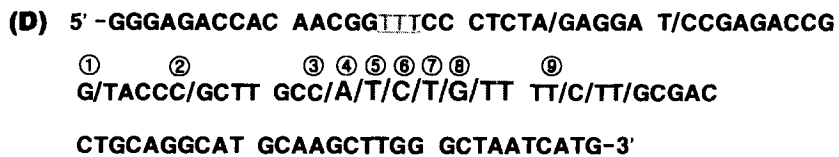


그림 3. PTH 전사종결 부위의 전사종결 위치에서의 야생형 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사 연장복합체 합성. (A) 야생형 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 생성물, (B) 전사연장 복합체에서의 Photo-crosslinking, (C) (B)에서의 cross-link를 (D) 전사 주형으로 사용된 PTH 전사종결 부위의 DNA 염기서열, (A)와 (D)의①-⑨ ; 전사 주형에서의 전사 진행된 전사연장 복합체의 위치를 표시함.

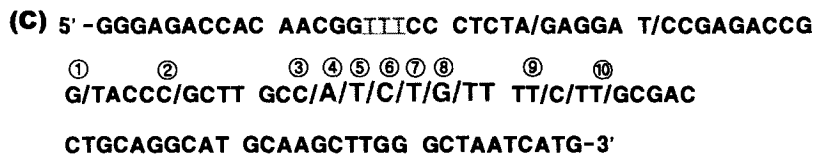


그림 4. PTH 전사종결 부위의 전사종결 위치에서의 R173C 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 합성. (A) R173C 돌연변이 T7 RNA 중합효소의 단계별 전사연장복합체 생성물, (B) 전사연장 복합체에서의 Photo-crosslinking, (C) 전사 주형으로 사용된 PTH 전사종결 부위의 DNA 염기서열, (A)와 (C)의①-⑩ ; 전사 주형에서의 전사 진행된 전사연장 복합체의 위치를 표시함.

#### IV. 감사의 글

이 논문은 한국과학재단 지정 배재대학교 바이오의약연구센터의 지원에 의해 수행되었습니다.

## V. 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.
- 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.
- Ikeda, R. A. and Richardson, C. C (1986) Interactions of the RNA polymerase of bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3614-3618.
- 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.
- 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.
- Lyakhov, D. L., He, B., Zhang, X., Studier, F. W., Dunn, J. J., and McAllister, W. T. (1998) Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **280**, 201-213.

- 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.
- 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.
- 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.
- Shin J. Y. (2002) Characterization of T7 RNA Polymerase Transcription Elongation Complex in Sequence-specific Transcription Termination. Master Degree Thesis, Pai Chai university, Taejon, 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.
- 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.