

## $\lambda P_R$ 프로모터 열린복합체 형성에 미치는 DNA Melting 부위 염기서열의 영향

정현채·노정혜

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

### Effect of Sequence Variations within DNA Melting Region on the Rate of Formation of Open Complexes at $\lambda P_R$ Promoter

Chung Hyun Chae and Jung-Hye Roe

Department of Microbiology, College of Natural Sciences

Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**ABSTRACT:** To examine the effects of sequence variations near the transcriptional start site on the rate of formation of the open complexes at bacteriophage  $\lambda P_R$  promoter, two mutant promoters were created by site-specific mutagenesis using synthetic oligonucleotides. Mutant I contains changes at positions -3 and -4 from TT to CC, thus having a 6-bp long G/C stretch between -10 region and transcriptional start site (+1). Mutant II has changes at positions -5 and -6 from GG to AA, thereby having a 9-bp long A/T stretch between positions -11 and -3. Selective filter binding assays were performed to measure the rate of formation of the open complexes between the wild-type or two mutant  $P_R$  promoters on 664 bp fragments and *E. coli* RNA polymerase at two temperatures. At 37°C, the wild-type and two mutants showed similar rates for the formation of open complex. The second order rate constant  $k_a$  and  $\tau_{int}$ , as determined from the  $\tau$ -plot analysis, were  $(6.0 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  and  $11 \pm 5 \text{ sec}$ , respectively. At 18°C, however, the wild-type and two mutant promoters showed differences in the kinetic parameters.  $k_a$  for the wild-type promoter was  $(2.2 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  and  $\tau_{int}$  was  $76 \pm 5 \text{ sec}$ . Mutant I and II exhibited differences mainly in the rate of isomerization ( $\tau_{int,I} = 91 \pm 10 \text{ sec}$ ,  $\tau_{int,II} = 34 \pm 7 \text{ sec}$ ), whereas the second order rate constant  $k_a$  was similar to the wild type value. This result implies that at 18°C, the isomerization rate is determined by both protein conformational change and DNA melting, which are separable kinetically according to the 3-step mechanism of Roe *et al.* (1984, 1985), and that the base changes affected mainly the rate of DNA melting as predicted.

**KEY WORDS**  $\lambda P_R$  promoter, Open complex, DNA melting, Site-specific mutagenesis,  $\tau$ -analysis.

원핵세포의 유전자 발현은 일차적으로 전사단계에서 조절된다. 전사 개시단계는 DNA의 특정 자리와 단백질들간의 상호작용을 통한 프로모터 특이적 조절을 받는다. RNA 전사체의 합성-뉴클레오타이드의 결합과 phosphodiester 결합의 형성-은 매우 빠르게 진행된다(Mangel & Chamberlin, 1974; Shimamoto 등, 1981). 따라서 프로모터의 열린 복합체(open complex)가 형성되는 과정이 그 프로모터로부터의 전사효율을 조절하는 주요 단계이다.

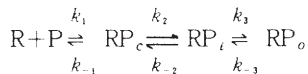
RNA 중합효소(RNAP 또는 R)와 프로모터(P)간의 상호작용을 통한 프로모터 열린 복합체( $RP_o$ )의 형성과정에 중간단계의 복합체(closed complex,  $RP_c$ )가 존재한다는 것이 여러 연구들을 통해 알려졌다(Strauss 등, 1980a, b; Hawley & McClure, 1980; Kadesch 등, 1982; Mulligan 등, 1984). McClure는 다양한 프로모터들에 대한 분석을 통해(McClure, 1985), 열린 복합체의 형성이 RNAP와 프로모터의 초기결합단계( $RP_c$  형성단계)와 이성화단계(isomerization,  $RP_c \rightarrow RP_o$ )의 2단계 기작으로

이루어진다고 제안하였다.



이 때, 이성화단계 ( $RP_c \rightarrow RP_o$ )의 속도상수  $k_2$ 가 전체반응의 속도를 결정하며, 그에 비해  $RP_c$  형성단계는 빠르게 평형상태에 도달하는 것으로 풀이되었다 (McClure, 1980, 1985).

그후 여러 연구들이 수행되면서, 열린 복합체 형성 과정에 더 많은 중간단계 복합체들이 존재한다는 실험 증거들이 얻어졌다 (Rosenberg 등, 1982; Kadesch 등, 1982). Roe 등 (1984, 1985)은 filter-binding 실험을 통해  $\lambda P_R$  프로모터에서의 열린 복합체 형성 과정을 연구하였다. 그 결과, 이차결합 속도상수  $k_d$ 가 온도의 영향을 크게 받으며, KCl 농도의 증가에 따라 크게 감소한다고 보고하였다. 역반응의 속도상수 (dissociation rate constant,  $k_d$ )도 온도의 영향을 크게 받으며,  $-9 \pm 4$  kcal의 활성화에너지를 갖는 것으로 알려졌다.  $k_d$ 값의 크기와,  $k_a$  및  $k_d$ 에 대한 온도와 염농도의 영향으로부터, 그들은 두 개의 중간단계 복합체를 갖는 3단계 기작을 제안하였다.



$RP_c \rightarrow RP_i$ 와  $RP_i \rightarrow RP_o$ 의 두 이성화단계는 온도의 영향을 크게 받으며,  $15^\circ\text{C}$  이상에서는  $RP_c \rightarrow RP_i$  단계가, 그리고  $13^\circ\text{C}$  이하에서는  $RP_i \rightarrow RP_o$  단계가 각각 전체반응의 속도결정단계인 것으로 나타났다.  $RP_c \rightarrow RP_i$  단계에서의 열용량 변화 ( $\Delta C_p^\circ$ )는  $-2.4$  kcal/deg로 나타났는데, 이는 RNAP의 형태변화 (conformational change)에서 비롯된 것으로 설명하였다.  $RP_i \rightarrow RP_o$ 의 단계는 DNA 이중나선이 풀어지는 단계로서, 온도의 영향을 가장 크게 받는 것으로 나타났다.  $RP_c$  복합체 형성단계는 이성화단계에 비해 빠르게 평형상태에 도달하며, 염농도의 영향을 가장 크게 받는다.

이 3단계 기작에 기초하여, 열린 복합체 형성과정의 속도결정단계에 따라 프로모터들을 범주화할 수 있다. 또한, 프로모터 구성요소들 즉,  $-35$  및  $-10$  보존부위와 두 보존부위간의 염기서열,  $-35$  부위 상단 및  $-10$  부위 하단의 염기서열, 그리고 전사개시부위 등이 열린 복합체 형성과정에서 수행하는 역할을 분석할 수 있게 되었다.

본 연구에서는  $\lambda P_R$  프로모터의  $-10$  부위와 전사개시위치의 사이 즉, DNA melting 부위 염기서열을 위치 선택적 돌연변이 방법으로 변화시켜, 그 염기서열의 변화가 열린 복합체 형성속도에 미치는 영향을 filter-binding assay를 통해 알아보고자 하였다. 이

는 Roe 등 (1984, 1985)의 3단계 모델에 근거하여 DNA melting 부위의 염기서열이 과연 3번째 단계 ( $RP_i \rightarrow RP_o$ )에만 관여하는지를 분석함으로써, 이 부분이 열린 복합체 형성과정에서 수행하는 역할을 밝히는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 운반체

M13mp19 파아지의 DNA를 얻기 위해 *E. coli* JM105와 *E. coli* RZ1032 (*dut<sup>-</sup> ung<sup>-</sup>*)를 사용하였다. 프로모터 절편을 대량으로 얻기 위하여는 *E. coli* HB101을 숙주로 사용하였다. 돌연변이체 제조와 염기서열 결정을 위하여는 M13mp19 파아지 (Messing, 1985)를, 프로모터 절편을 대량으로 얻기 위해서는 pUC18 플라스미드를 운반체로 사용하였다.

### 효소, 시약 및 방사성 물질

시약은 주로 Sigma에서, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP, [5- $^3\text{H}$ ]dCTP, [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP 등 방사성 물질들은 Amersham에서 구입하였다. 제한효소와 T4 DNA polymerase, Klenow 효소, T4 ligase, T4 kinase, Sequenase 등은 New England Biolabs. (NEB), Promega, 제철화학, United States Biochemical Corp. 등에서 구입하였다. 염기서열 결정용 primer는 NEB (#1212, 17-mer)에서 구입하였고, 돌연변이체 제조에 사용한 oligonucleotide들 (Fig. 1)은 미국 Wisconsin 대학교의 Biotechnology Center와 KAIST의 유전공학센터에 의뢰하여 합성하였다.

*E. coli* RNA polymerase (RNAP)는 Wisconsin 대학교의 Dr. Burgess로부터 제공받았다. RNAP는 50% (v/v) glycerol 보관용 완충용액 (Burgess & Jendrisak, 1975)에 넣어  $-20^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 사용시에는 결합용 완충용액으로 희석하였다. 이 효소의 결합활성은 물리적 농도의 약 40%임이 Roe 등 (1984)의 방법으로 결정되었다.

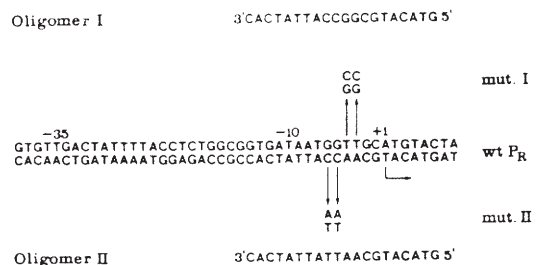


Fig. 1. Sequences of wild-type and mutant  $P_R$  promoters and the oligonucleotides used for the site-specific mutagenesis.

### 위치선택적 돌연변이 및 DNA 염기서열 결정

$P_R$  프로모터를 가진 890 bp HaeIII 절편을 Bgl II와 HindIII로 절단하여 전기영동으로 644 bp 절편을 분리하고, BamHI과 HindIII로 절단한 M13 mp19에 클로닝하였다. 위치선택적 돌연변이체 제조는 Kunkel(1985)의 방법을 따랐다. 약 12 ng의 heteroduplex DNA를 JM105(*dut<sup>+</sup> ung<sup>+</sup>*)에 형질 전환시켜  $2 \times YT$  고체배지에서 12-16시간 배양하여  $3 \times 10^4$  plaques/ $\mu g$  DNA의 효율로 plaque를 얻었다. 돌연변이 파아지를 JM105에 감염시켜 단선 DNA를 얻어 Sanger 등(1977)의 방법으로 염기서열을 결정하였다.

### 프로모터 DNA 절편의 정제 및 동위원소 표지

확인된 돌연변이와 야생형 프로모터 절편을 다량으로 얻기 위해  $P_R$  프로모터를 pUC18 운반체로 클로닝한 재조합 플라스미드를 만들었다(Chung, 1990). PEG와 에탄올 침전으로 정제한 플라스미드 DNA를 EcoRI와 HindIII로 절단한 후, 0.8% agarose 또는 6% 수평 polyacrylamide 겔에 전기영동시켜 electroelution으로 프로모터 절편을 회수하였다. 프로모터 DNA를 phenol/chloroform 추출과 에탄올 침전으로 정제한 후, Klenow 효소를 이용해 [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] dATP 또는 [ $\alpha$ - $^{35}S$ ] dATP로 말단표지(end-labeling) 시키거나, T4 DNA polymerase를 이용하여 [ $5$ - $^3H$ ] dCTP로 치환표지(replacement labeling) 시켰다. DNA에 삽입되지 않은 dNTP의 제거를 위해, 에탄올로 DNA를 침전시키고, 6% 수평 polyacrylamide 겔에 전기영동시켜 electroelution으로 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA를  $NH_4OAc$ 와 에탄올로 2회 침전시켜 정제하였다.

TCA 침전방법으로 측정된 dNTP의 잔류정도는 전체 cpm의 10% 미만이었다. 표지된 DNA의 specific activity는 [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] dATP로 표지한 경우는  $2 \times 10^7$  cpm/ $\mu g$  DNA 이었고, [ $\alpha$ - $^{35}S$ ] dATP 또는 [ $5$ - $^3H$ ] dCTP로 표지한 경우는 각각  $6 \times 10^6$  cpm/ $\mu g$  DNA,  $1 \times 10^7$  cpm/ $\mu g$  DNA 이었다.

### Filter binding assays

표지된 DNA 절편과 RNAP의 결합반응과 여과는 Roe 등(1984)의 방법을 따랐다. 결합용 완충용액(binding buffer, BB)의 조성은 40 mM Tris(pH 8.0), 10 mM  $MgCl_2$ , 120 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT이며, Tris의 pH는 실험온도에서 8.0이 되도록 HCl로 적정하였다. 세척용 완충용액(washing buffer, WB)의 조성은 10 mM Tris(pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 0.1 M NaCl(0.1 M WB) 또는 0.8 M NaCl(0.8 M WB)이었다.

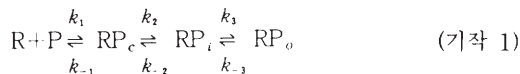
프로모터 복합체의 선택적 검출을 위해 heparin competition assay를 수행하였다. 1.2 ml BB에

$2 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  cpm에 해당하는 프로모터 절편을 첨가하였다. RNAP를 반응용액에 넣고 10초간 pipet tip으로 저어 섞어주었다. RNAP 첨가 후, 4분이 경과할 때까지 매 30초마다 90  $\mu l$ 의 반응용액을 덜어내어 10  $\mu l$  heparin 용액(0.5 mg/ml)과 10초간 섞고 BB로 적신 filter에 걸러(Manifold filtration apparatus, Hoeffer), 500  $\mu l$ 의 0.1 M WB로 1회 세척하였다. 세척한 filter를 건조시켜 organic scintillation cocktail이 들어있는 vial에 넣고 cpm을 측정하였다. 기저 잔류량(background retention)은 RNAP 첨가 전의 반응용액 90  $\mu l$ 를 heparin과 섞어 같은 방법으로 여과한 후 cpm을 측정하여 결정하였다. 최대 잔류량(maximum retention)은 RNAP 첨가 후 10분과 20분이 경과하였을 때, 각각 90  $\mu l$ 의 반응용액을 덜어내어 같은 방법으로 측정하였다. 반응용액에 첨가한 프로모터 절편의 총 cpm은, 10-45  $\mu l$ 의 반응용액을 filter에 바로 묻힌 후 건조시켜 측정하였다.

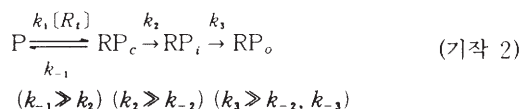
$P_R$  프로모터 열린 복합체만의 특이적 관찰을 위해, NTP 안정화를 또한 시도하였다. 이는  $P_R$  프로모터 특이적인 조성의 NTP(CpA+UTP+GTP) 용액을 반응용액과 섞어 고농도의 염에도 안정한 3차 복합체(ternary complex, DNA+RNAP+RNA)가 형성되도록 한 후 여과하는 방법이다. 프로모터 DNA를 함유한 1.2 ml BB에 RNAP를 첨가하고 4분이 경과할 때까지 매 30초마다 90  $\mu l$ 의 반응용액을 덜어내어 10  $\mu l$  NTP 용액(0.1 M)과 10초간 섞고 filter에 걸러 500  $\mu l$ 의 0.8 M WB와 0.1 M WB로 각 1회 세척하여 잔류 cpm을 측정하였다. 기저 잔류량은 RNAP 첨가 후 4.5분이 경과하였을 때, 반응용액 90  $\mu l$ 를 10  $\mu l$  heparin 용액(0.5 mg/ml)과 섞어준 후 측정하였다.

### 속도상수의 결정

열린 복합체 형성과정의 속도상수들을 결정하기 위해 Roe 등(1984, 1985)의 3단계 기작에 따라  $\tau$ -plot 분석(McClure, 1980)을 수행하였다.



$[P_i]$ 가 총 프로모터 농도일 때,  $[R_i] > [P_i]$ 인 pseudo first order 조건하에서 기작 1을 다음과 같이 단순화 할 수 있다.



기작 2에서,  $[RP_i]$ 가 steady-state에 있다고 가정할 때, 아래의 관계식을 유도할 수 있다.

$$[RP_o] = [P_t] (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (\text{식 1})$$

$$\tau_{obs} = k_{obs}^{-1} = (K_1 k_2)^{-1} [R_t]^{-1} + (k_2^{-1} + k_3^{-1}) \quad (\text{식 2})$$

$\tau_{obs}$ 의 실험적 결정은  $\ln(1 - [RP_o]/[P_t]) = -k_{obs} \cdot t$ 의 관계식(식 1의 변형)에 의거, 시간에 따른 프로모터 점유율 ( $\theta = [RP_o]/[P_t]$  = 잔류 cpm/최대 cpm)을 plotting한 semi-log graph로부터 계산한다.  $k_{obs}$ 의 분석은 식 2의 관계로부터  $\tau$  plot(plot of  $\tau_{obs}$  vs.  $[R_t]^{-1}$ )을 작성하여, 직선의 기울기는 이차결합상도상수  $k_a (=K_1 k_2)$ 의 역수로, Y축 절편  $\tau_{int}$ 는  $k_2^{-1} + k_3^{-1}$ 로 해석한다.

## 결 과

### $\lambda P_R$ 프로모터의 돌연변이체 제조 및 확인

$\lambda P_R$  프로모터의 하단부위(-11~-1) 즉, DNA melting 부위의 AT 함량변화가 프로모터 열린 복합체 형성속도에 미치는 영향을 알아보기 위해, 합성 oligonucleotide를 이용한 위치선택적 돌연변이 방법으로 두 종류의 돌연변이 프로모터를 제조하였다. 돌연변이 I은 -3과 -4 위치의 TT 염기가 CC로 치환되어, -10 보존부위와 전사개시위치 사이에 6개의 연속된 GC 염기쌍을 갖는다. 돌연변이 II는 -5와 -6 위치의 GG 염기를 AA로 치환하여, -11부터 -3 위치까지 연속된 9개의 AT 염기쌍을 갖는다

(Fig. 1).

Kunkel(1985)의 방법으로 얻은 heteroduplex DNA를 JM105에 형질전환시켜,  $3 \times 10^4$  plaques/ $\mu$ g DNA의 효율로 plaque를 얻었다. 각 돌연변이 별로 10개의 plaque를 골라내어 DNA 염기서열 결정을 통해 돌연변이가 재조합 파아지를 찾아내었다(Fig. 2). 위치선택적 돌연변이의 효율은 돌연변이 I의 경우는 50%, 돌연변이 II의 경우는 20%이었다. 위의 돌연변이 파아지용액을 다시한번 plaque purification을 통해 순수분리한 후, 염기서열을 재확인 하였다.

### 열린 복합체 형성속도 측정

Heparin competition과 NTP 안정화 실험을 통해 열린 복합체 형성속도를 측정하였다. 결합용 완충용액은 표준조성(40mM Tris, pH8.0, 10mM  $MgCl_2$ , 120mM KCl, 0.1mg/ml BSA, 1mM DTT)을 사용하였다. 반응용액 내의 DNA 농도( $\leq 0.1$ nM)에 대한 RNAP 농도(2nM-20nM, 물리적 농도)의 비는 20-200배로 하여, pseudo first order 조건을 충족시켰다.

37°C에서 야생형 및 돌연변이 프로모터들에 대하여 heparin competition과 NTP 안정화 실험을 수행한 결과들 중 하나를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3의 결과는 야생형의 경우로서, 이 때의 RNAP 활성농도는 3.2nM이었다. 그림에서 보여지듯, heparin com-

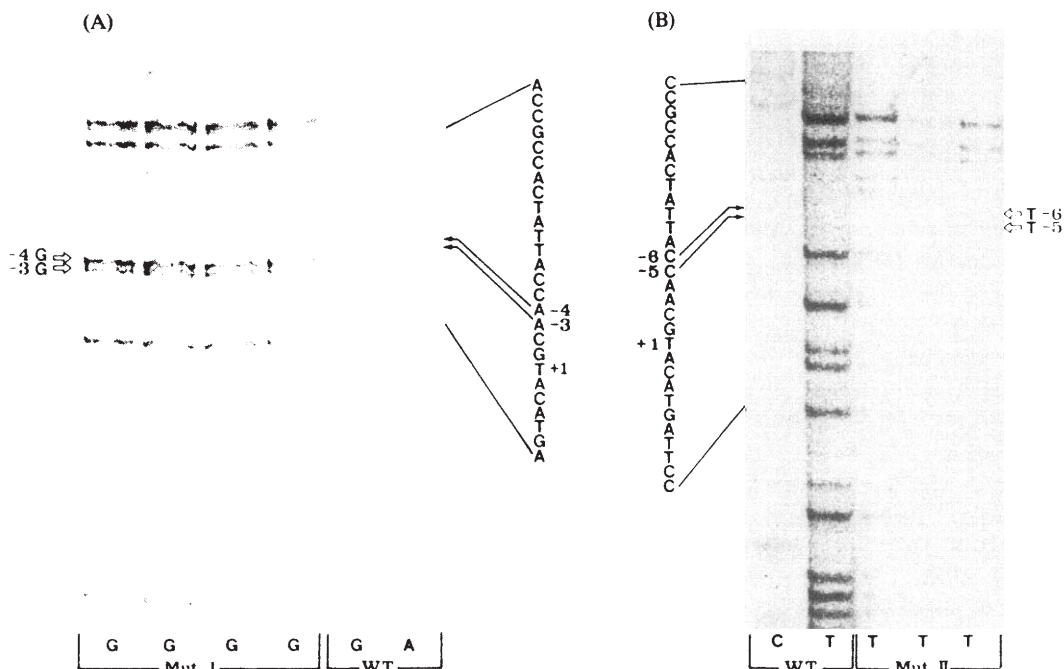
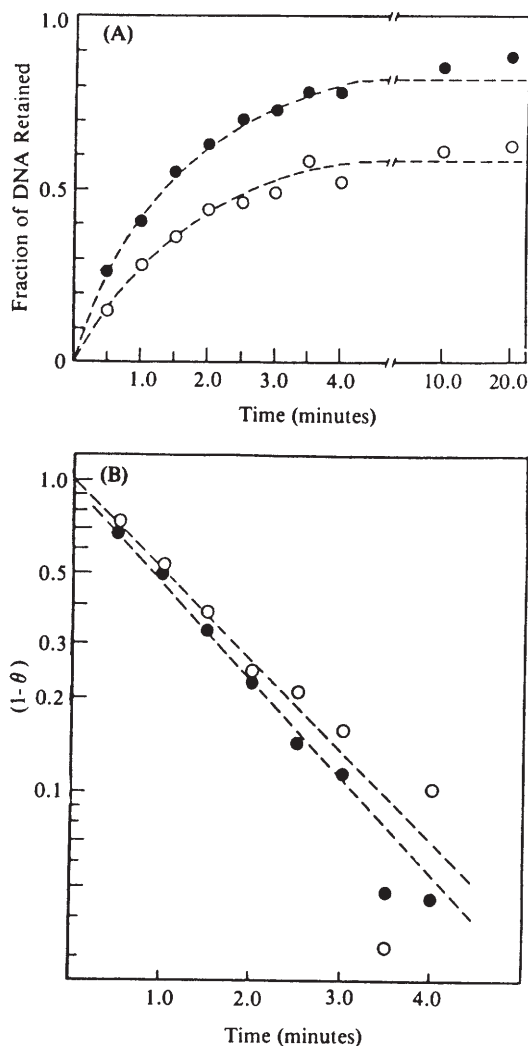


Fig. 2. Confirmation of sequences of mutant I (A) and mutant II (B) by dideoxy DNA sequencing.





**Fig. 3.** Time dependence of formation of the filter-retainable complexes between RNAP and wild-type  $P_R$  promoter.

(A);  $^3\text{H}$ -labeled  $P_R$  fragment (0.1 nM) was incubated with RNAP (3.2 nM active) in BB at  $37^\circ\text{C}$ . At times indicated, samples were removed and assayed either with heparin competition (●) or with NTP-stabilization (▲; CpA, UTP, GTP) as described in the text. (B); Semi-log plot of  $(1 - \theta)$  vs. time.

petition과 NTP 안정화에 의해 관찰된  $\text{RP}_0$  형성 과정은 비슷한 양상을 나타내었다. 그러나, RNAP/DNA의 당량비가 커질수록, heparin competition에서 프로모터 이외의 tight-binding 부위의 영향이 나타났다. 즉, NTP 안정화에서와는 달리, 시간 변화에 따른 잔류 cpm의 변화가 큰 편차를 보였으며, 같은 조건의 실험을 반복 수행할 경우, 매번의 결

과들이 큰 차이를 보였다. 따라서, 속도상수의 계산을 위해서는 NTP 안정화 실험의 결과만을 사용하였다. NTP 안정화에 사용한 CpA는  $P_R$  프로모터에서 형성된  $\text{RP}_0$  복합체만을 특이적으로 안정화시키므로, tight-binding 부위의 영향을 제거할 수 있다 (Roe 등, 1984; Hawley & McClure, 1982; Shih & Gussin, 1983).

Fig. 3A는 반응용액에 넣어준 총 cpm에 대한 filter 잔류 cpm의 비율을 시간의 함수로 나타낸 것이다. 최대 잔류량은 heparin competition에서는 70-90%, NTP 안정화에서는 55-80% 수준이었다. NTP 안정화에서의 최대 잔류량이 낮은 것은, 생성되는 3차 복합체 중 일부에서 abortive initiation에 의해 RNA가 떨어지기 때문으로 여겨진다 (Roe 등, 1984). 기저잔류량은 heparin competition에서는 5%, NTP 안정화에서는 10% 이하이었다.

Fig. 3B는 Fig. 3A에서 구한 최대 잔류량을 기준으로 각 시점에서의 프로모터 점유율 (promoter occupancy,  $\theta$ )을 semi-log 그래프로 나타낸 것이다. Fig. 3B에서, 직선의 기울기로부터 결합속도상수  $k_{obs}$ 를 구하고, 그 역수를 취하여 시간상수  $\tau_{obs}$ 를 구하였다. Heparin competition과 NTP 안정화에 의한  $k_{obs}$ 의 값은 각각  $1.96 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 와  $1.61 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 이었다.

#### $37^\circ\text{C}$ 에서 열린 복합체 형성

$37^\circ\text{C}$ 에서 야생형 및 돌연변이 프로모터 절편에 대하여 여러 RNAP 농도에서  $k_{obs}$ 를 측정한 결과를  $\tau$ -plot으로 나타내었다 (Fig. 4). 이를 보면, 야생형과 두 돌연변이 프로모터들이 유사한 결합속도를 보임을 알 수 있다. 선형 회귀분석에 의한 직선의 방정식은 다음과 같다.

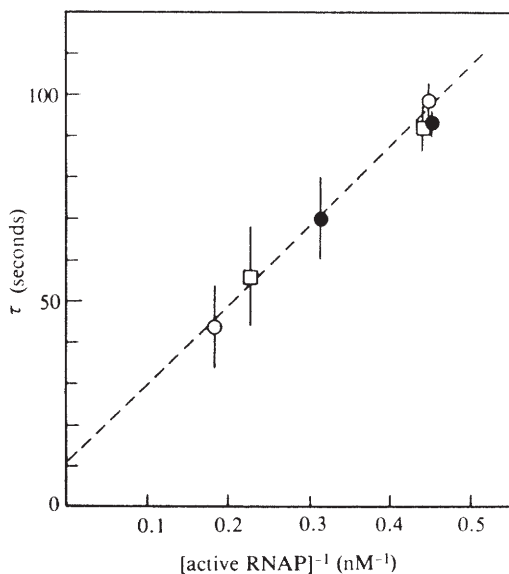
$$\tau_{obs} = (1.7 \pm 0.1) \times 10^{-7} [\text{RNAP}]^{-1} + (11 \pm 5)$$

직선의 기울기로부터 구한  $k_d$ 의 값은  $(6.0 \pm 0.4) \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 이었다.

Roe 등 (1984, 1985)의 보고에 의하면,  $\lambda P_R$  프로모터의 경우,  $37^\circ\text{C}$ 에서는 DNA melting이 전체  $\text{RP}_0$  복합체 형성속도에 별 영향을 미치지 않는다고 한다. 따라서 두 돌연변이 프로모터들이  $37^\circ\text{C}$ 에서는 야생형과 큰 차이를 보이지는 않으리라고 추측할 수 있다. 그러나,  $37^\circ\text{C}$ 에서의 열린 복합체 형성은 매우 빠르게 이루어지므로, 야생형 및 두 돌연변이들간의 차이를 관측하지 못하였을 수도 있다. 속도상수들을 정확한 측정이 용이한 범위로 낮추고, 또한 속도결정 단계를 DNA melting 단계로 이동시켜 돌연변이의 효과를 보기 위해, 보다 낮은 온도에서 실험을 수행할 필요가 있었다.

#### $18^\circ\text{C}$ 에서의 열린 복합체 형성

$18^\circ\text{C}$ 에서 야생형 및 돌연변이 프로모터 절편에 대하



**Fig. 4.**  $\tau$ -plot analysis for the formation of open complexes between RNAP and  $P_R$  promoters at 37°C.

Time constants  $\tau_{obs}$  defined as the inverse of the pseudo-first order rate constants obtained, are plotted as a function of the inverse of the active RNAP concentration for wild-type (●), mutant I (□), and mutant II (○) promoters.

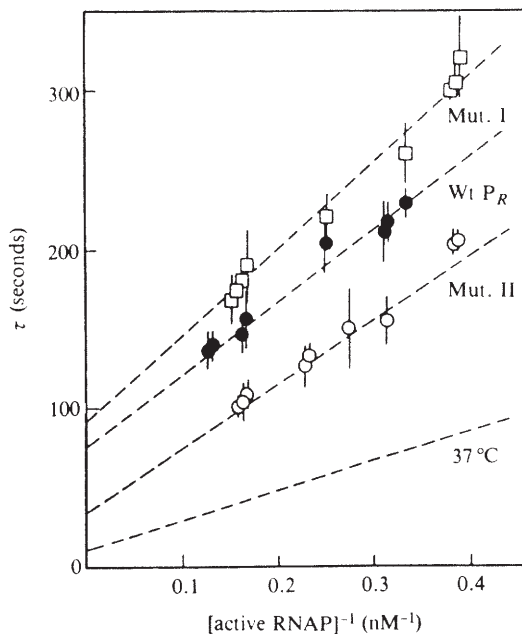
여, 여러 RNAP 농도에서 NTP 안정화실험을 통해 일차 결합속도상수를 결정하고, 그로부터  $\tau_{obs}$ 를 구하여  $\tau$ -plot을 작성하였다 (Fig. 5). 18°C에서 NTP 안정화실험을 수행하였을 때, 최대 잔류량과 기저 잔류량은 37°C에서와 별다른 차이를 보이지 않았다. 선형 회귀분석에 의한 각 직선의 방정식은 다음과 같다.

$$\tau_{obs,wt} = (4.6 \pm 0.2) \times 10^{-7} [\text{RNAP}]^{-1} + (76 \pm 5)$$

$$\tau_{obs,I} = (5.3 \pm 0.6) \times 10^{-7} [\text{RNAP}]^{-1} + (91 \pm 10)$$

$$\tau_{obs,II} = (4.1 \pm 0.1) \times 10^{-7} [\text{RNAP}]^{-1} + (34 \pm 7)$$

야생형 프로모터의 경우, 온도가 37°C에서 18°C로 낮아짐에 따라 이차결합 속도상수가  $(2.2 \pm 0.1) \times 10^6$



**Fig. 5.**  $\tau$ -plot analysis for the formation of open complexes at 18°C for wild type (●), mutant I (□), and mutant II (○) promoters.

$\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 감소하고, 동시에  $\tau_{int}$ 의 값은  $76 \pm 5$ 초로 증가하였다. 마찬가지로, 돌연변이 I과 II에서도 이차결합 속도상수가 각각  $(1.9 \pm 0.3) \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 과  $(2.4 \pm 0.1) \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 감소하였으며,  $\tau_{int}$ 의 값도 각각  $91 \pm 10$ 초와  $34 \pm 7$ 초로 증가하였다 (Table 1). 18°C에서 세 종류의 프로모터들을 서로 비교하여 보면, 돌연변이 I과 II는 모두 야생형과 비슷한 이차결합속도를 나타내나  $\tau_{int}$ 의 값이 돌연변이 I은 약 15초 정도 증가하고, 돌연변이 II는 약 40초 정도 감소하였다. 이는 돌연변이의 효과가 주로 이성화 단계에 있음을 시사한다.

**Table 1.** Kinetic parameters obtained from  $\tau$  analysis

Temperature (°C)	Promoter	$a k_a \times 10^{-6}$ ( $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )	$\tau_{int}$ (sec)	$b k_i \times 10^2$ ( $\text{sec}^{-1}$ )	$c K_1 \times 10^{-7}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$d K_1 \times 10^{-7}$ ( $\text{M}^{-1}$ )
37	Wt. & Mut.	$6.0 \pm 0.4$	$11 \pm 5$	$9.2 \pm 3.0$	$6.6 \pm 2.7$	$\leq 6.6$
18	Wt.	$2.2 \pm 0.1$	$76 \pm 5$	$1.3 \pm 0.1$	$16.7 \pm 1.1$	$\leq 7.5$
18	Mutant I	$1.9 \pm 0.3$	$91 \pm 10$	$1.1 \pm 0.1$	$16.9 \pm 1.4$	$\leq 6.6$
18	Mutant II	$2.4 \pm 0.1$	$34 \pm 7$	$2.9 \pm 0.5$	$8.3 \pm 1.8$	$\leq 8.3$

a;  $k_a = K_1 k_2$

b;  $k_i = \tau_{int}^{-1} = (1/k_2 + 1/k_3)^{-1}$

c; calculated by assuming  $k_2 = k_i$  (Roe et al., 1984, 1985)

d; calculated by assuming  $k_2 \geq k_{i,II}$

## 고 찰

돌연변이 I과 II는 promoter 인지서열은 그대로 두고, DNA melting 부위의 염기서열(AT 함량)을 변화시킨 돌연변이들이다. 돌연변이 I은 melting 부위의 AT 함량이 야생형보다 감소하여, DNA melting이 더 어렵도록 하였고, 돌연변이 II는 AT 함량이 증가하여, 야생형보다 쉽게 DNA melting이 일어날 수 있게 고안하였다. 따라서 Roe 등(1984)의 3단계 기작에 따르면, 세번째 단계 즉, 전사개시위치 부근의 DNA 이중나선이 풀어지는 단계에 그 영향을 미치며, 결국 온도변화에 따른 영향이 매우 클 것으로 예상할 수 있다.

37°C와 18°C에서 filter-binding assay를 수행한 결과, 37°C에서 야생형과 두 돌연변이들은 열린 복합체 형성속도에서 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 37°C에서는 DNA melting이 빠르게 이루어지므로, 야생형 및 두 돌연변이가 갖고 있는 AT 함량의 차이가 큰 의미를 지니지 못하는 것으로 여겨진다. 또는, 37°C에서는 열린 복합체 형성과정이 빠르게 이루어져 결합반응속도의 정확한 측정이 어렵기 때문에 야생형과 두 돌연변이들간의 차이를 관측하지 못하였을 수 있다. 따라서, 결합반응속도를 정확한 측정이 가능한 범위로 낮추고, DNA melting 단계가 속도결정에 더 큰 영향을 주도록 하기 위하여 18°C로 온도를 낮추어 실험을 수행하였다. 18°C에서 두 돌연변이 프로모터의 이차결합 속도상수  $k_a$ 의 값은 야생형과 거의 비슷한 반면,  $\tau_{int}$ 의 값은 돌연변이 I이 약 15초 정도 증가하였고, 돌연변이 II의 경우는 약 40초 정도 감소하였다. 이는 melting 부위의 AT 함량과 melting 속도의 상관성을 시사한다.

Roe 등(1985)의 3단계 기작에 따르면,  $\tau_{int}$ 는  $RP_c \rightarrow RP_i$  단계의 속도상수  $k_2$ 와  $RP_i \rightarrow RP_o$  단계의 속도상수  $k_3$ 에 의해 결정되며, 그 관계식은 다음과 같다:  $\tau_{int} = k_i^{-1} = k_2^{-1} + k_3^{-1}$ . 종래의 관찰에 의하면  $\lambda P_R$  프로모터의 경우, 15°C 이상에서는  $k_2$ 가  $k_3$ 보다 매우 느리고( $k_3 > k_2$ ), 따라서  $\tau_{int}$ 에서  $k_3$ 가 차지하는 부분은 거의 무시될 수 있다고 여겨졌다(Roe 등, 1985). 이 경우,  $k_i$ 는  $k_2$ 가 가질 수 있는 최소값이므로,  $k_2 = k_i$ 로 가정하고  $k_a = K_1 k_2$ 의 관계식으로부터  $K_1$ 의 최대값을 계산할 수 있다. 그러나, Table 1에서 이렇게 계산된  $K_1$ 의 값을 보면, 돌연변이 II는

37°C와 18°C에서 비슷한 값을 나타냈으나, 야생형과 돌연변이 I은 오히려 18°C에서 더 큰 값을 가졌다.  $RP_c$ 의 형성은 비교적 온도에 무관한 단계로 알려진 것에 비추어 볼 때(Roe 등, 1984, 1985; Hawley & McClure, 1982), 이것은 이전의 결과와 상반된다. 또한  $RP_c$ 의 형성이 낮은 온도에서 오히려 더 빨라진다고 보기는 더욱 어렵다. 따라서 18°C에서  $k_i = k_2$ 라는 가정이 바람직하지 않다고 생각된다. 결국, 18°C에서의 야생형 및 돌연변이 프로모터들간의  $\tau_{int}$ 의 차이는 일차적으로 melting 단계의 속도상수  $k_3$ 가 변화하였기 때문으로 여길 수 있다. 이 때, 돌연변이 I은 야생형보다  $k_3$ 가 더욱 늦어져  $\tau_{int}$ 가 따라서 더 증가하였고, 돌연변이 II는 야생형보다  $k_3$ 가 더욱 빨라져  $\tau_{int}$ 가 따라서 감소하였다고 해석할 수 있다. 이에 의하면, 돌연변이 II의  $\tau_{int}$ 는 야생형이나 돌연변이 I과 비교하여,  $k_2$ 와  $k_3$  중  $k_2$ 의 영향이 더욱 크리라 예상할 수 있다. 이를 근거로 돌연변이 II의  $\tau_{int} = k_2^{-1}$ 이라 가정하고  $K_1$ 을 다시 계산하면, 야생형과 돌연변이 I의  $K_1$ 이 각각  $(7.5 \pm 1.7) \times 10^7 M^{-1}$ 과  $(6.6 \pm 2.2) \times 10^7 M^{-1}$ 로 나타나, 37°C에서의  $(6.6 \pm 2.7) \times 10^7 M^{-1}$ 과 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 5°C에서  $RP_c$ 의 형성을 독립적으로 측정된 결과에 따르면(Roe and Chung, 미발표결과)  $K_1$ 의 값이 위의 계산치와 비슷한  $6 \times 10^7 M^{-1}$  정도임이 밝혀져, 18°C에서  $\tau_{int}$ 의 변화가 protein conformation의 변화보다는 DNA melting 속도를 반영하리라는 가정을 뒷받침해주고 있다.

이상의 고찰을 통하여,  $P_R$  프로모터의 DNA melting 부위 염기서열이 변화된 두 돌연변이 프로모터들이 열린 복합체 형성과정의 마지막 단계인 DNA melting 단계에서 일차적으로 야생형과 차이를 보이는 것으로 추정할 수 있었다. 즉, melting 부위의 AT 함량변화는 일차적으로  $RP_i \rightarrow RP_o$  단계의 속도상수에 영향을 미치며, 이러한 영향은 주로 melting 부위의 AT 함량의 변화에 따른 melting potential의 차이 때문으로 생각된다. 그러나, 이러한 해석을 견고하게 뒷받침하기 위해서는,  $RP_c$  복합체 형성단계의 평형상수  $K_1$ 을 독립적으로 정확하게 측정하는 실험과 더 많은 여러 온도에서의 열린 복합체 형성속도상수들을 측정하는 실험들을 병행하여 수행할 필요가 있다.

## 적 요

$\lambda P_R$  프로모터의 전사개시위치 부근의 염기서열 변화가 프로모터 열린 복합체 형성속도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 위치선택적 돌연변이의 방법으로 두 가지 돌연변이 프로모터를 만들었다. 돌연변이 I은 -3와 -4 위치의 TT 염기들을 CC로 치환하여 -10 보존부위(Pribnow Region)와 전사개시위치 사이에 6개의 연속된 GC 염기쌍을 갖도록 만든 것이며, 돌연변이 II는 -5와 -6 위

치의 GG 염기들을 AA 로 치환하여 -11과 -3 위치 사이의 9개 염기쌍을 모두 AT 염기쌍으로 만들었다. 37°C와 18°C에서, 야생형 및 두 돌연변이 P<sub>R</sub> 프로모터들 (664-bp, EcoRI-HindIII 절편)에 대한 selective filter binding assay를 수행하였다. 그 결과, 37°C에서는 야생형과 두 돌연변이 프로모터들이 비슷한 열린 복합체 형성속도를 나타내었다. 각 프로모터의 이차결합 속도상수  $k_d$ 는  $(6.0 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  이었고,  $\tau_{int}$ 는  $11 \pm 5$  초이었다. 그러나, 18°C에서는 야생형과 두 돌연변이 프로모터들의 속도상수들이 다르게 나타났다.  $k_d$ 의 값은 약  $2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 모두 비슷한 반면,  $\tau_{int}$ 는 야생형이  $76 \pm 5$  초, 돌연변이 I이  $91 \pm 10$  초, 돌연변이 II가  $34 \pm 7$  초로 나타났다. 이는 18°C에서  $\tau_{int}$ 가 단백질의 형태변화 뿐 아니라 DNA melting 속도에 의해서도 결정되며, melting 부위의 AT 함량이 Roe 등 (1984, 1985)의 3단계 기작에 의해 예측된 대로 DNA melting 속도와 상관관계를 가짐을 시사한다.

## 사 사

본 연구는 1989년도 과학재단 국제공동연구비로 수행되었음.

## 참고문헌

- Burgess, R.R. and J.J. Jendrisak, 1975. A procedure for the rapid, large-scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin-P precipitation and DNA-cellulose chromatography, *Biochemistry* **14**, 4634-4638.
- Chung, H.C., 1990. Effects of sequence variations within the melting region on the rate of formation of open complexes at  $\lambda$  P<sub>R</sub> promoter, M.S. Thesis, Seoul National University.
- Hawley, D.K. and W.R. McClure, 1980. Mutations affecting two different steps in transcription initiation at the phage  $\lambda$  P<sub>RM</sub> promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**, 496-500.
- Hawley, D.K. and W.R. McClure, 1982. Mechanism of activation of transcription initiation from the  $\lambda$  P<sub>RM</sub> promoter, *J. Mol. Chem.* **197**, 493-525.
- Kadesch, T.R., S. Rosenberg and M.J. Chamberlin, 1982. Binding of Escherichia coli RNA Polymerase Holoenzyme to Bacteriophage T7 DNA, *J. Mol. Biol.*, **155**, 1-29.
- Kunkel, T.A., 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **82**, 488-492.
- Mangel, W.F. and M.J. Chamberlin, 1974. Studies of ribonucleic acid chain initiation by Escherichia coli ribonucleic acid polymerase bound to T7 DNA, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2995-3006.
- McClure, W.R., 1980. Rate-limiting steps in RNA chain initiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**, 5634-5638.
- McClure, W.R., 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes, *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 171-204.
- Messing, J., 1985. New M13 vectors for cloning, pp. 20-79, In *Methods in Enzymology*, 101.
- Mulligan, M.E., D.K. Hawley, R. Entriken and W.R. McClure, 1984. *E. coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity, *Nucl. Acid. Res.* **12**, 789-800.
- Roe, J.-H., R.R. Burgess and M.T. Record Jr., 1984. Kinetics and mechanism of the interaction of *E. coli* RNA polymerase with the  $\lambda$  P<sub>R</sub> promoter, *J. Mol. Biol.* **176**, 495-521.
- Roe, J.-H. and M.T. Record Jr., 1985. Temperature dependence of the constants of the *E. coli* RNA polymerase- $\lambda$  P<sub>R</sub> promoter interaction: Assignment of the kinetic steps corresponding to protein conformational change and DNA opening, *J. Mol. Biol.* **184**, 441-453.
- Rosenberg, S., T.R. Kadesch and M.J. Chamberlin, 1982. Binding of *E. coli* RNA Polymerase holoenzyme to bacteriophage T7 DNA, *J. Mol. Biol.*, **155**, 31-51.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**, 5463-5467.
- Shih, M.-C. and G.N. Gussin, 1984. *J. Mol. Biol.* **172**, 489-506.
- Shimamoto, N., F.Y.-H. Wu, and C.-W. Wu, 1981. *Biochemistry* **20**, 4745-4755.
- Strauss, H.S., R.R. Burgess, and M.T. Record Jr., 1980a. Binding of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme to a bacteriophage T7 promoter-containing fragment: selectivity exists over a wide range of solution conditions, *Biochemistry* **19**, 3496-3504.
- Strauss, H.S., R.R. Burgess, and M.T. Record Jr., 1980b. Binding of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme to a bacteriophage T7 promoter-containing fragment: evaluation of promoter binding constants as a function of solution conditions, *Biochemistry* **19**, 3504-3515.

(Received February 8, 1990)

(Accepted March 2, 1990)