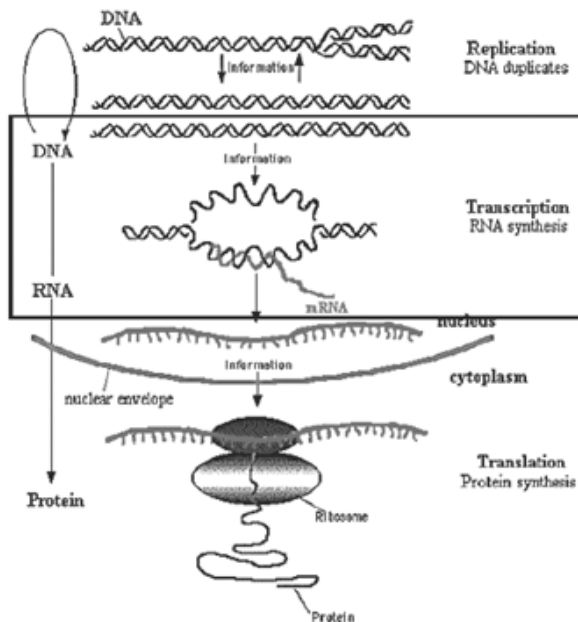


# Transcription machinery의 핵심분자 RNA polymerase II의 구조와 작동메커니즘

강 린 우 건국대학교 신기술융합학과 / Lkang@konkuk.ac.kr

모든 생물체는 유전물질로 DNA나 RNA를 가지며, 생명을 유지하고 증식하기 위한 대부분의 정보를 안에 저장하고 있다. 저장된 유전정보는 외부의 자극이나 필요에 따라서 즉시 꺼내져 발현되어야 하며, 이는 매우 복잡한 조절과정을 통해 전개된다. 유전자 발현과정의 중요성은 프랜시스 크릭(Francis Crick)에 의해 처음 사용된 “Central Dogma of Molecular Biology”란 말로서 대표될 수 있으며[그림 1], DNA에서 RNA가 합성되는 transcription(전사)과정과 RNA에서 단백질이 형성되는 translation(번역)과정으로 나뉜다. 대부분의 유전자 발현조절은 transcription 단계에서 이루어지고, 진핵세포 내에서 이를 수행하는 핵심 분자가 바로 RNA polymerase II(Pol II)이다. 이 글을 통해 Pol II의 연구역사 및 구조와 기능에 대해 간략히 소개하려 한다.

RNA polymerase II (Pol II)는 거대 단백질 복합체로서 12개의 subunit(polypeptide chain)으로 이루어져 있다. RNA polymerase가 처음 밝혀진 것은 1955년 세바로 오코야(Severo Ochoa)에 의해

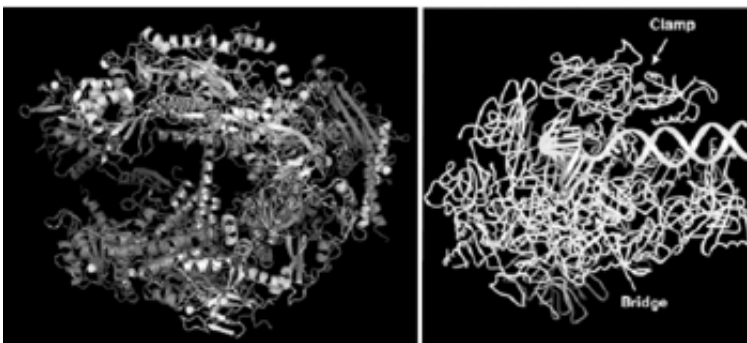


[그림 1] Molecular Biology의 Central Dogma. Francis Crick이 “What Mad Pursuit”란 책에서 처음 사용한 말로 유전정보는 nucleotide나 단백질 아미노산의 정확한 순서로 단백질로 만들어진 후에는 다시 꺼내질 수 없음을 의미하며, 이는 미래에 더 강력하고 중심적인 의미를 가질 것으로 예상했다.

서이며, 오키어는 1959년에 DNA polymerase를 찾은 Arthur Kornberg와 의학/생리학 분야의 노벨 상을 공동 수상하였다. 약 30년 후 마침내 분자수준의 삼차원 구조가 2000년에 로저 콘버그(Roger Kornberg) group에 의해 밝혀졌고, 이로 인해 Roger는 2006년 노벨 화학상을 수상하였다. (Roger Kornberg는 Arthur Kornberg의 아들로 현재 함께 미국의 Stanford University School of Medicine에 재직 중이다.)

The Royal Swedish Academy of Sciences가 주목한 그의 업적은 1970년대 eukaryotic DNA packaging의 기본 단위인 nucleosome 발견보다도 transcription을 수행하는 여러 단계별 RNA polymerase II의 분자수준 구조 결정이다. Roger는 이를 통해 30여년 이상 풀리지 못했던 유전자 발현의 세부 작동 메커니즘을 밝혔다. 분자수준이라 함은 모든 물질을 이루는 개개 원소들의 상대적인 위치를  $10^{10}$  m (Å)의 정확도로 결정해 내는 것을 의미하며(이는 현재 이야기되고 있는 나노수준보다 10배나 더 작은 수준이다). 구조는 기능을 이해하는데 중요한 역할을 한다. 삼차원 구조결정을 위해서 Roger는 12 subunits, 3,500개 이상의 아미노산으로 이루어진 대형 단백질 복합체를 생체에서 존재하는 똑같은 상태로 순수하게 분리해 냈으며, 그 단백질 복합체의 순수결정을 얻어냈다. 순수 결정은 방사능가속기로부터 high quality의 x-선을 사용하여 회절 data를 얻게 되고, data는 컴퓨터를 통해 분석 및 해석됨으로서 마지막으로 실제 atom들의 삼차원적인 구조정보를 얻는데 쓰여 진다. (현재 한국도 포항 방사능가속기에 미국의 Berkeley, Stanford, Cornell, Brookhaven등과 같이 여러 x-ray beam line을 고분자 물질 분석을 위해 가지고 있다.) 실제 수행된 내용은 RNA polymerase II의 생물학/의학적 중요도를 제외하고라도 대형복합체의 구조로서 큰 의미를 가진다.

PoI II의 기본 구조를 살펴보면 다음과 같다. Rpb1과 Rpb2는 RNA polymerase II의 가장 큰 두 subunit으로 기본 틀을 이룬다 [그림 2]. PoI II의 surface는 DNA double helix가 binding하는



[그림 2] 12 subunits의 RNA polymerase II 중 Rpb4/7을 제외한 10 subunits의 RNA polymerase II backbone model (reprints from Science, 2000[1]; Science, 2001[2]).

Free RNA polymerase II와 DNA/RNA와 binding된 elongation complex의 backbone model로 7개의 structural  $Zn^{2+}$  이온은 연푸른색 볼로, active site에 존재하는 1개의  $Mg^{2+}$  이온은 자주색 볼로 나타내어 졌다. 오른쪽 그림의 clamp는 DNA와 binding시 가장 큰 conformation 변화를 일으키며, 연두색의 bridge helix는 RNA strand에 nucleotide addition후 translocation에 역할을 한다고 추측되고 있다.

cleft를 제외하고는 거의 전부가 negative charge를 띠고 있으며, DNA binding여부에 따라 open/close 상태로 conformation 변화를 보이는 clamp부위와, downstream dsDNA strand와 upstream DNA/RNA hybrid가 직각으로 꺾이게 되는 wall부위, nucleotide가 RNA strand로 합성을 위해 diffusion되어 들어가게 되는 funnel부위, Pol II 중심에 존재하는 Mg<sup>2+</sup> ion과 pore를 포함하는 active site등으로 이루어져 있다 [1-3]. Pol II는 12개의 서로 다른 subunit으로 이루어져 있음에도 불구하고, 53,000 Å에 달하는 면적(이 중 약 30%가 Rpb1과 Rpb2사이의 interaction)이 subunit interface에 묻혀있고 매우 stable한 구조를 가지고 있다. 12개의 subunit중 Rpb4와 Rpb7을 제외한 10개의 subunit만으로도 transcription을 수행하는데 문제는 없다.

이번 노벨상의 직접적인 계기가 된 연구가 바로 2004년 Cell지에 실린 Pol II가 RNA strand에 nucleotide를 합성해가는 세부 메커니즘을 분자수준으로 밝혀낸 연구이다 [그림 3] [4]. 기존의 Pol II transcription elongation complex를 만들기 위해 사용한 tailed template와 달리 single strand template DNA, single strand RNA 및 single strand non-template DNA가 *in vitro* 상에서 assemble/annealing 되어졌으며, 이 DNA/RNA hybrid를 Pol II에 binding 시킴으로서 기존과 다른 Pol II 구조를 얻게 되었다. 이 구조의 특징은 nucleotide가 RNA strand에 addition 되어진 후에 RNA strand가 한 칸 뒤로 translocation 되어진 구조로 기존의 구조와 달리 nucleotide addition site가 비어있는 차이점이 존재 했다. 이를 이용해 base-pair가 맞지 않는 nucleotide를 Pol II에 soaking하여 Pol II가 인식하는 nucleotide affinity를 재는 시도가 이루어 졌고, 이 과정에서 미처 예상치 못했던 삼차원 구조가 얻어졌다. 실제 soaking 된 nucleotide는 기존의 알려진 nucleotide addition site (A site)와 근접하지만 다른 binding site를 찾게 해 주었으며, 이 site가 nucleotide entry site (E site)이다. E site 는 A site와 α-phosphate의 위치가 같으나 base와 sugar를 포함한 부위가 거의 180도 rotation 되어 있다. 이는 기존의 transcription에 관여하는 polymerase activity에 관한 정설을 바꾼 내용으로 진행 세포가 무핵세포에 비해 좀 더 복잡한 nucleotide selection mechanism을 가짐을 시사한다. 실제 이 차이점은 550kDa이 넘는 전체 Pol II중에서 약 0.2kDa도 안되는



[그림 3] RNA strand에 nucleotide addition에 따른 transcription mechanism. (reprint from Cell, 2004 [3]) Eukaryotic RNA polymerase II는 T7 RNA polymerase II와 달리 nucleotide entry site (E site)가 존재해 nucleotide는 먼저 E site에 binding후 rotation을 통해 addition site (A site)로 움직이고 RNA strand에 incorporation되어지게 된다.


부분으로 전체 구조의 약 1/1000보다 적은 아주 작은 차이이다. 특히 이와 같은 거대한 구조는 high resolution의 x-ray diffraction을 얻기 힘들고 이 구조들도 약 4 Å의 resolution으로 얻어졌음을 고려할 때, 이를 detection하기는 쉽지 않았다. 세심한 관찰과 분석 및 토론이 Roger Kornberg에게 2006년의 Nobel 상의 영광을 낳았다.

Transcription 과정은 initiation, elongation 및 termination으로 나뉘며, Pol II는 각 단계에서 수백 개의 서로 다른 전사요소들의 도움을 받으며 transcription을 수행하게 된다. 위와 같이 Pol II의 구조가 결정된 후에는 Pol II가 여러 transcription factor들에 의해 어떻게 활성이 조절되는지가 가장 활발히 연구되고 있다. 지금까지 수백 가지의 transcription factor들 중에 단지 2개만이 Pol II와 complex 상태로 구조가 결정되었을 뿐이며 [5, 6], 따라서 아직 수행 되어질 많은 일이 존재한다.

Roger가 제공한 RNA polymerase II의 구조는 human Pol II가 아닌 yeast Pol II이다. 그럼에도 불구하고 큰 의미를 지닌다. 진핵세포가 가지는 첫 번째 Pol II의 구조로 human Pol II와 약 53%의 sequence identity를 가진다. 이는 매우 높은 homology로 yeast Pol II의 구조를 바탕으로 human Pol II의 구조를 prediction할 수 있으며 매우 신빙성 있는 결과를 얻을 가능성이 높다. 실제 modelling 결과 yeast Pol II와 E.coli RNA polymerase II는 sequence homology가 active site에만 존재할 뿐이지만, yeast Pol II와 human Pol II의 sequence는 분자 전체에 걸쳐 conserved된 모습을 보인다. 이는 transcription mechanism이 bacteria와 eukaryote에서 다르게 진화하였음을 보여주고 있으며, eukaryote에서 만의 conserved transcription factor들이 존재하고 이들이 Pol II와 interaction함을 잘 뒷받침 하고 있다.

이와 같이 여러 transcription factor들에 의한 transcription조절 메커니즘은 기초과학 연구로서 중요할 뿐 아니라 여러 난치병과 밀접한 연관이 있다. 먼저 암을 살펴보면, 매우 복잡한 질병으로 아직 까지도 완전한 이해는 하지 못하고 있으나, genetic disease로서 그 원인이 유전자 구조의 변화나 발현의 이상이라는 데는 이견이 없다 [7, 8]. Transcription은 유전자 발현의 첫 단계이며 가장 중요한 단계로 p53, stat3, NF $\kappa$ B,  $\beta$ -catenin, c-jun등과 같은 많은 transcription factor들이 oncogene 임이 이미 밝혀져 있다. 이미 MLN944(phase I) [9], flavopiridol(phase II) [10]와, R-roscovitine(phase II) [11]등의 임상실험단계 항암제가 transcription과정을 저해해 오고 있음이 밝혀져, Pol II의 활성 저해제는 타 항암제와 보완하여 쓰여질 수 있는 큰 가능성을 가지고 있다. AIDS를 일으키는 HIV의 경우에도 바이러스 증식에 유리하도록 인간생체 내 전사과정을 이용한다. HIV 자신이 coding하는 단백질 Tat가 Pol II/DSIF(negative transcription elongation factor)와 직접 binding함으로써 자신의 유전자를 인간 유전자보다 빨리 발현시키는데 이용한다 [12]. 이 단계는 anti-HIV drug개발에 중요한 단계이다.

실제 생체 내의 단백질들은 여러 motif와 domain들의 상호작용을 통해 이루어진 복합체로서 그 기

능을 수행한다. 지금까지 단백질 기능과 작용메커니즘을 살펴보기 위한 최선의 방법 중 하나가 삼차원 구조를 결정하는 방법이다. 많은 soluble한 단백질의 삼차원 구조가 폭발적으로 결정되었음에도 불구하고 대형 단백질 복합체에 대한 정보는 아직 미비하다. 550kDa이 넘는 Pol II 복합체의 구조는 생물학/의학적 가치의 중요도를 넘어서, 기존에 삼차원 구조정보의 범위를 multi-subunit 대형 단백질 복합체로 확대하는 바탕이 될 것이다. 

## References

1. Cramer, P., et al., Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **2000**. 288(5466): p. 640-9.
2. Gnatt, A.L., et al., Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*, **2001**. 292(5523): p. 1876-82.
3. Westover, K.D., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*, **2004**. 119(4): p. 481-9.
4. Westover, K.D., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*, **2004**. 303(5660): p. 1014-6.
5. Bushnell, D.A., et al., Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Ångstroms. *Science*, **2004**. 303(5660): p. 983-8.
6. Kettenberger, H., K.J. Armache, and P. Cramer, Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, **2004**. 16(6): p. 955-65.
7. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, **1993**. 9(4): p. 138-41.
8. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, p53 function and dysfunction. *Cell*, **1992**. 70(4): p. 523-6.
9. Byers, S.A., et al., The antiproliferative agent MLN944 preferentially inhibits transcription. *Mol Cancer Ther*, **2005**. 4(8): p. 1260-7.
10. Chen, R., et al., Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*, **2005**. 106(7): p. 2513-9.
11. MacCallum, D.E., et al., Seliciclib (CYC202, R-Roscovotine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res*, **2005**. 65(12): p. 5399-407.
12. Wu-Baer, F., W.S. Lane, and R.B. Gaynor, Role of the human homolog of the yeast transcription factor SPT5 in HIV-1 Tat-activation. *J Mol Biol*, **1998**. 277(2): p. 179-97.