

효모 ABF1 단백질의 DNA Binding 부위에 대한 구조 기능 연구

조기남 · 이상경² · 김홍태 · 김지영² · 노현모¹ · 정구홍*

서울대학교 생물교육과 ¹분자생물학과, ²경희대학교 유전공학과

ABF1 (Autonomously replicating sequence Binding Factor 1)은 효모 genome에서 RTCRYN, ACG의 염기 서열을 가지고 있는 promoter, mating-type silencer, ARS에 결합하는 DNA binding 단백질이다. *E. coli*에서 ABF1 유전자를 발현하기 위하여, ABF1 유전자를 pMAL-c2 벡터에 cloning 하였다 (pMAHW). pMAHW를 *E. coli*에 형질전환하여, ABF1 융합단백질을 발현시키고, amylose resin affinity chromatography에 의하여 분리하였다. Factor Xa protease를 이용하여 분리된 융합단백질로부터 maltose binding protein을 잘라낸 후에 gel retardation analysis 방법으로 분리된 ABF1이 ARS1에 결합하는 능력을 지니고 있음을 확인하였다. DNA 결합에 관련된 부위를 찾기 위하여, 비전형적인 zinc finger motif가 위치하는 자리에서 pMAHW의 ABF1 유전자에 His-61을 다른 아미노산으로 치환하였다. DNA binding 부위로 추정되는 ABF1 단백질의 중간지역에 Leu-353, Leu-360를 다른 아미노산으로 치환하였다. Site-specific mutagenesis를 통해 만들어진 mutant를 gel retardation analysis와 complementation test를 통해서 비전형적인 zinc finger motif 이외에 다른 DNA binding motif가 있는 것을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ ABF1, affinity chromatography, gel retardation assay, complementation

Autonomously replicating sequence (ARS) Binding Factor 1 (ABF1)은 염기서열이 RTCRYN, ACG인 부분을 특이하게 인지하는 DNA 결합 단백질이다. ABF1이 인지하는 염기서열은 ARS, MAT (mating type)의 silencer copy인 HMR과 HML의 mating type silencers, 여러 유전자의 promoter의 UAS(upstream activating sequence)에서 나타나며, ABF1은 위와 같은 DNA 부위에 결합하여, DNA 복제에 관여하고 HML과 HMR의 전사를 억제하며, 전사를 활성화시키는 여러 기능을 각각 가지고 있다. ABF1 단백질은 여러분야에서 연구되었고, OBF1 (6), ABF1/SBE-B (20), GF1 (5), SUF (7), SFB-B (21), TAF (11) 등의 여러 이름으로도 알려져 있으나, 모두 ABF1과 동일한 단백질이다.

ABF1의 첫번째 기능은 ARS에 결합하여 DNA 복제에 관여하는 것이다. Yeast에는 400여개의 ARS가 존재하며, 이중 20여개가 밝혀졌다 (2). ARS는 모든 ARS에서 보존되고 있는 ARS core consensus sequence (ACS)를 포함하는 domain A와 ACS의 T-rich region에 3'쪽의 서열인 domain B로 구성된다. Domain B는 ARS기능의 효율을 위해 필요하며, B1, B2, B3로 구성되어 있다. ABF1, ACBP (8), DBFA가 ARS에 결합하는 것으로 밝혀졌는데, ABF1이 인지하는 염기서열은 B3 domain에 위치한다. ARS의 mutational analysis의 결과에 따르면, ABF1은 ARS에 trans-acting element로 작용하나, ARS 활성화에 반드시

필요하지는 않으며, 복제초기에 보조적인 역할을 하는 것으로 보인다 (2).

ABF1의 두번째 기능은 mating type 유전자인 HML과 HMR의 silencer에 결합하여 HML과 HMR의 전사를 억제하는 것이다. *Saccharomyces cerevisiae*의 mating type은 chromosome III MAT locus에 a 또는 α allele의 존재에 따라 결정된다. MAT locus의 왼쪽에 존재하는 HML에는 α allele가 있고, 오른쪽 HMR에는 a allele가 존재하지만 4개의 SIR 단백질 (silent information regulator) (20)과 RAPI, ABF1에 의하여 전사가 억제되어 MAT locus의 유전자에 따라 mating type이 결정되게 된다 (21).

ABF1의 세번째 기능은 ABF1이 여러 유전자의 promoter내의 UAS에 결합하여 전사를 활성화시키는 것이다. ABF1은 yeast RNA polymerase의 두 유전자인 RPC16, RPC40 (20), pyruvate kinase 유전자 (PYK1), phosphoglycerate kinase 유전자 (PGK) (3), YPT1, TUB2 (9), enolase 유전자인 ENO1, ENO2 (2), ribosomal protein S33 (7), L3 (10, 22)와 mitochondria 단백질을 coding하는 핵 유전자들 (5)의 UAS에 결합하여 전사를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. Database search 결과에 따르면 현재까지 밝혀진 yeast 유전자중 80여개 이상의 유전자 promoter UAS에서 ABF1 인지 염기서열이 나타난다 (17).

EMBL과 NBRF data base의 조사 결과에 따르면 ABF1과 어떤 단백질 사이에는 유의적인 유사성은

없었다. 특히 ABF1은 여러 eukaryotic transcription factor에서 발견되는 전형적인 metal binding protein인 zinc finger 구조가 아니라, 비전형적인 zinc finger motif를 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, 즉 3개의 Cys과 2개의 His이 41에서 71 사이의 아미노산 서열에서 Cys은 49, 66, 71 위치에서 His은 57, 61 위치에서 나타난다. 이와같이 Cys과 His의 간격과 배열이 전형적인 zinc finger motif와 일치하지 않는다. 그러나 zinc ion을 제거한 상태에서 DNA 결합 능력을 조사한 결과 DNA결합 능력을 상실했다는 보고(4)에 의하면 분명히 zinc finger motif를 지니고 있다. 또한 Halfter 등은(10) His 57 → Gln 또는 Cys 71 → Ser인 돌연변이가 DNA에 결합하지 못하므로 His 57, Cys 71이 DNA 결합에 연관됨을 보였고, Campbell 등도(18) Cys 49 → Tyr인 온도 감수성의 돌연변이종이 DNA에 결합하지 못했다고 보고하고 있다. 그리고 deletion mutant의 분석에 의하면 대략 1에서 530까지의 아미노산 부위가 있어야 안정하게 DNA에 결합한다는 보고도 있다(10). 그러나 현재까지의 DNA-binding 지역에 관한 연구에 의하면 첫째 어떤 형의 zinc finger를 가지는지에 대해서 견해들이 서로 일치하지 않고, 둘째 DNA 결합에 관련된 부위가 단지 N-terminal region에 있는 zinc finger motif만 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서는 zinc finger motif에 His-61을 Ala으로 변경하고, zinc finger motif로 판명된 자리 이외의 중간지역에 다른 DNA 결합부위가 있는지를 알아보기 위하여 중간지역에 있는 Leu353과 Leu360를 Arg으로 mutagenesis하고 zinc finger motif 이외의 다른 DNA 결합부위를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

균주와 플라스미드

Escherichia coli NM522[(F' *lacIq*Δ(*lacZ*)M15proAB/*supE thi*Δ(*lac-proAB*)Δ(*hsdMS-mcrB*)5(*rk-mk-McrB*-)]는 모든 재조합 plasmid에 대한 host로 사용하였다. *E. coli* 발현 벡터로는 New England Biolabs에서 구입한 pMAL-c2 plasmid를 사용하였다. 25°C에서는 성장할 수 있으나, 37°C에서는 살 수 없는 *Saccharomyces cerevisiae* YCA35 (*MAT a, trp1, ura3-52, lys2-801, ade2-1, gal, abf1-5*)(18) 온도 감수성 돌연변이 균주를 형질전환에 사용하였다. Yeast 발현 벡터로는 ABF1 promoter와 ORF를 지닌 YEp24-3a(17)를 사용하였으며, 이 플라스미드에 각 돌연변이 부위를 클로닝하였다.

pMAHW expression vector의 제조

YEp24-3a(17)를 *Bgl*II로 잘라 4.5 kb DNA 조각을 얻고 M13mp18을 *Bam*HI로 잘라, 클로닝하여 M13mp18ABF1을 만들었다. DEL oligonucleotide (5'-cagcactaagcttccatcctgtg-3')를 사용하여, mutagenesis한 결과 ABF1의 start codon

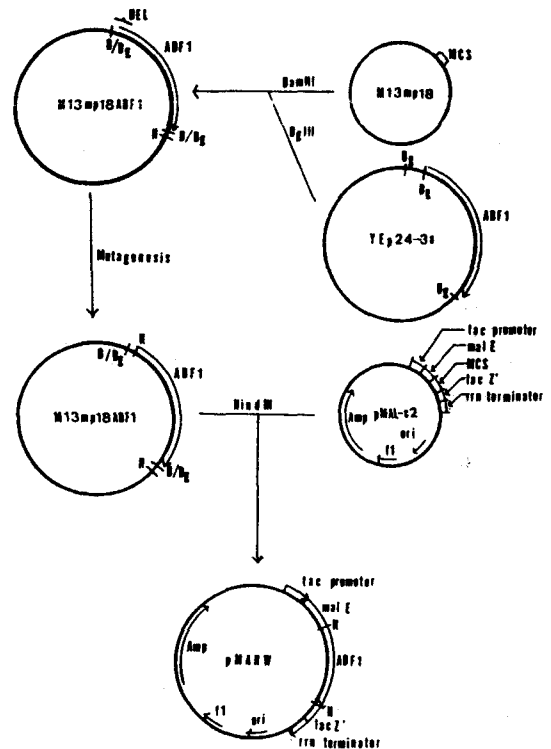


Fig. 1. Schematic diagram of the construction of pMAHW containing ABF1 gene. MCS is multiple cloning site. E, H, Bg and B; restriction enzyme sites of *Eco*RI, *Hind*III, *Bgl*II and *Bam*HI, respectively.

sis한 결과 ABF1의 start codon 근처에 *Hind*III enzyme site가 형성되었다. *Hind*III enzyme site가 형성된 M13mp18ABF1을 *Hind*III로 잘라서 pMAL-c2 vector에 cloning하여, 결국 ABF1과 MBP (maltose binding protein)가 융합된 pMAHW expression plasmid를 제조하였고 (Fig. 1), DNA 염기 서열 결정으로 ORF (open reading frame)이 연결됨을 확인하였다 (Fig. 2).

배지와 배양조건

pMAHW3의 expression plasmid를 지닌 *E. coli*을 LB (Bactotrypton 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l)에 밤새도록 배양하고, 1/100으로 희석하여, glucose-containing LB(Bactotryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, glucose 2 g/l) 배지에서 배양했다. Ampicillin은 100 μg/ml로 사용했다. OD₆₀₀ 0.5에서 IPTG를 최종농도가 0.3 mM이 되게 배양액에 넣고, 계속해서 32°C에서 3시간 동안 배양하였다. Yeast의 경우에 YEPD (yeast extract 10 g/l, Bactopeptone 20 g/l, glucose 20 g/l) 배지와 selctive minimal media (yeast nitrogen base 1.7 g/l, ammonium

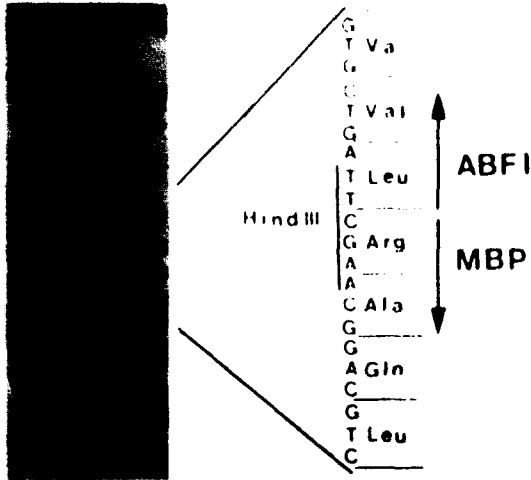


Fig. 2. Autoradiography showing nucleotide sequence of the fusion region between ABF1 and MBP.

Table 1. Sequences of synthetic oligonucleotides.

oligonucleotide name	sequence (5' ----- 3')
ZINC-1	TGTA AAAATCTTTGTCC
LEU-1	ATCTTAGTCTAATAAAATTT
LEU-2	TCGTTTGTCTAATCTTTGG
LPRIMER	TTTAAATTACTCACTG
pMAL-c2 forward primer	GGTCGTCAGACTGTGCATGAAGCC

sulfate 5 g/l, glucose 20 g/l) 배지를 사용하였다.

Mutagenesis

ABF1 구조 유전자가 클로닝된 pMAHW의 phagemid 상태에서 uracil이 함유된 single-strand DNA를 제조하여 Kunkle method를 따라 돌연변이를 만들었다(14). 사용한 oligonucleotide의 서열은 Table 1과 같다. Oligonucleotide를 이용하여 mutagenesis 하고, DNA 염기서열 결정으로 돌연변이를 찾을 때 Leu-1, Leu-2는 LPRIMER를 primer로 사용하였고 ZINC는 pMAL-c2의 forward primer를 사용하였다.

효모의 형질 전환

Yeast, YCA35 (16)의 경우에는 25°C에서 24시간 진탕 배양하여 50 ml의 YEPD 배지에 1/100 희석하여 접종한 후에 OD₆₀₀ 0.5~1 사이의 배양액 30 ml를 4000 rpm으로 수확하였다. 10 ml의 Li acetate 용액 [0.5 M Li acetate, 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA]으로 세포를 씻은 후에 1 ml의 Li acetate 용액에 살며시 흔들어서, 100 µl에 10 µl의 DNA가 함유된 용액을 넣고 10분간 실온에서 방치후에 50% PEG 6000가 포함된 Li acetate 용액을 280 µl 넣고 30°C에서 45분간 방치하고, DMSO를 43 µl를 더하고 42°C에서 열충격을 준 후에 selective media에 형질

전환 시킨 세포를 깔았다(12).

융합 단백질의 정제

IPTG로 induction하여 배양한 세포를 4000×g에서 수확했다. 침전된 세포는 wet weight의 두배 부피의 column buffer[10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 200 mM NaCl]에 현탁하여 씻고 wet weight의 두배의 column buffer에 다시 현탁하여, French press로 세포를 분해한 후에 13000×g로 원심 분리하였다. 상층액을 모아 1 : 10으로 희석하여 amylose resin affinity column (1.5×3 cm)을 통과시켰다. 그리고 resin packing volume의 8배의 column buffer로 씻은 후, 10 mM maltose column buffer로 elution하여 각 1 ml씩의 fraction을 20개 받았다(11). SDS-PAGE 및 Immunoblot

정제된 protein의 분자량 및 순도 확인은 Laemmli법 (15)에 따라 SDS-PAGE를 시행하였고 protein의 정량은 Lowry 방법 (16)을 사용하였다. pMAL-c2 plasmid가 갖고 있는 fusion protein인 maltose binding protein에 대해 토끼에서 만들어진 항혈청을 1차 항체로 하고 염소에서 만들어진 토끼에 대한 항혈청을 2차 항체로 하여 이것에 horse radish peroxidase를 접합시켜 immunoblot을 시행하였다. 1차 항체는 New England Biolabs에서 2차 항체는 Jackson Laboratory에서 구입하였다.

Gel retardation analysis

Gel retardation에 사용되는 probe는 yeast ARS1 region의 B3 element를 33-mer의 oligonucleotide (5'-GAATTCATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTG)로 만들어서 hybridization하고, end filling 방법으로 sequenase를 사용하여 α-³²P-dATP로 labelling한 후, 0.25 ng 정도를 분리한 ABF1 단백질 1 µg과 섞고, binding buffer[20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol]에서 20분 동안 binding시킨 후에 0.5×TBE, 6% acrylamide gel에서 전기 영동한 후 말려서 autoradiography하였다. Nonspecific competitor로는 salmon sperm DNA를 200 ng 사용하였다. Specific competitor로는 ARS1의 B3 oligonucleotide를 사용하였다.

Complementation test

Campbell 등에 (18) 의하여 제조된 온도 감수성 돌연변이인 YCA35에 형질전환하여 각각 25°C와 37°C에서 배양 후 성장도를 조사하였다.

결과 및 고찰

Site-specific mutagenesis

ABF1의 49에서 71 사이의 아미노산 배열에 Cys과 His이 단지 3 또는 7개의 아미노산 간격을 띄고 Cys은 3번, His은 2번씩이나 존재하기 때문에 어떤 아미노산이 직접 zinc 이온과 배위 결합을 하여 zinc finger의 구조를 형성하는지를 알 수 없다. ABF1 단백질의 49, 55, 71 아미노산은 이미 Campbell과

Table 2. Nucleotide and amino acid change in mutant.

Mutant name	Nucleotide affected	Nucleotide change	Amino acid change
ZINC(H61A)	181	C→G	His61→Ala
LEU-1(L353R)	1056	C→T	
	1057	C→A	Leu353→Arg
	1058	T→G	
LEU-2(L360R)	1081	T→A	Leu360→Arg
	1082	T→G	
LEU-12 (L353R/L360R)	1056	C→T	
	1057	C→A	Leu353→Arg
	1058	T→G	
	1081	T→A	Leu360→Arg
	1082	T→G	

Halfter에 의하여 DNA 결합에 중요하다고 밝혀졌다 (18, 10). 그러므로 49, 55, 71번째 아미노산 이외의 His-61 아미노산을 Ala으로 치환하였다. 또한 DNA 인지부위가 TC와 ACG로 양분되어 있는 사실과 ABF1 단백질안에 basic amino acid residue를 지니는 부위가 중간부위에 있으므로 또 다른 DNA binding motif가 존재할 가능성이 있다. 그러므로 ABF1 gene의 중간 지역에 basic amino acid residue를 지니는 부위의 Leu-353, 360을 다른 아미노산으로 치환하였다 (Table 2). 돌연변이는 염기 서열 결정으로 확인하였다 (Fig. 3).

Gel retardation analysis

*E. coli*에서 발현시킨 ABF1 단백질이 DNA binding activity를 지니고 있는지를 확인하기 위하여 gel

retardation을 시행하였다. Fusion된 ABF1 단백질을 Factor Xa로 잘라낸 후, ABF1 단백질 1 µg과 α-³²P-labelled ARS1 B3 element oligonucleotide(0.25 ng)를 섞고 0.5×TBE, 6% acrylamide gel에 전기영동하여서 autoradiography한 결과, 발현된 ABF1 protein이 ARS1 DNA와 complex를 이룬 것을 확인하였다 (Fig. 4). 이 사실은 yeast에서 분리한 ABF1과 *E. coli*에서 발현시킨 단백질이 동일한 결합능력을 지닌다는 Halfter 등의 결과 (10)와 일치하였다. 또한 그 complex가 정확한 ABF1/ARS1 complex인가를 확인하기 위하여 unlabelled ARS1 B3 element oligonucleotide를 농도별로 competition한 결과, band가 사라지는 것으로 보아서 ABF1/ARS1 complex임을 확인하였다 (Fig. 4). 돌연변이 단백질을 wild type ABF1과 동일한 조건하에서 발현하고 분리한 후에 위와같은 방법으로 gel retardation assay를 시행하였다. ZINC (H61A), LEU-2 (L360R), LEU-12 (L353R/L360R) 돌연변이는 결합능력을 상실하였으며, LEU-1 (L353R)는 DNA에 매우 약하게 결합하였다 (Fig. 5). 이것으로 보아 61번째 아미노산 인 His은 Zinc finger motif를 형성하는데 중요하게 작용하며, ABF1의 ORF에 Leu-353, Leu-360 아미노산이 치환된 돌연변이도 DNA 결합기능이 매우 약해지거나, 상실하는 것으로 보아, 지금까지 연구된 ABF1의 DNA binding domain에 대하여 알려지지 않은 제 2의 DNA binding motif가 존재하는 것으로 추정하고 있다. LEU-12 돌연변이는 DNA 결합능력이 사라졌는데 이것은 LEU-1 (L360R) 돌연변이가 완전히 DNA 결합능력이 없기 때문에 L353과 360에

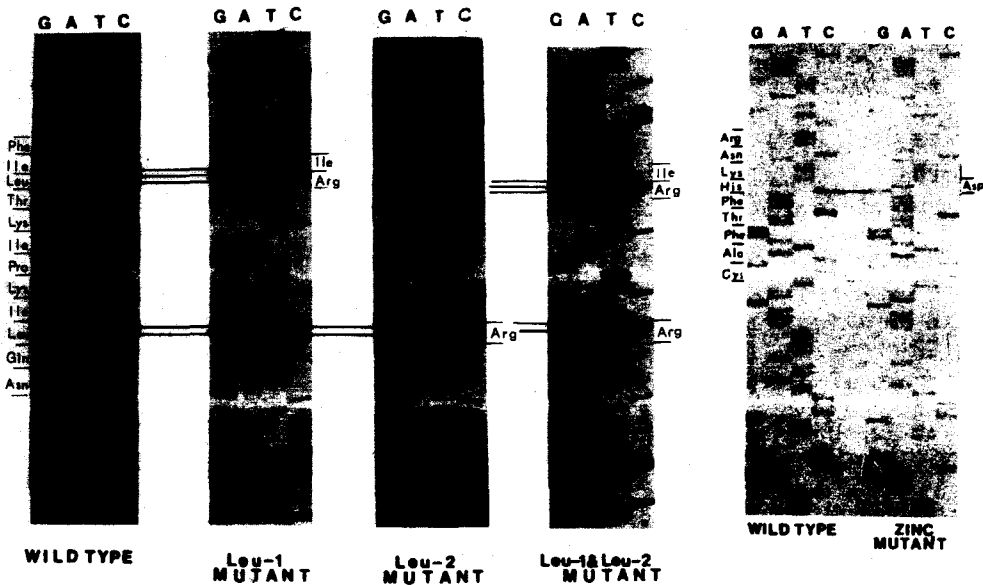


Fig. 3. Autoradiography showing nucleotide sequences of mutants.

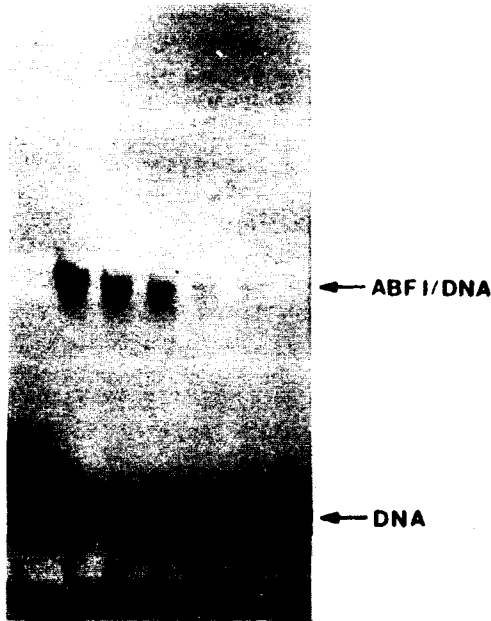


Fig. 4. Competition DNA-protein binding analysis with double stranded oligonucleotides corresponding to ARS1 B3 element.

Gel retardation analysis was performed with an α -³²P-labelled ARS1 B3 element oligonucleotide in the presence of increasing amounts of competitor. 1, free labelled oligonucleotide (ARS1) 0.25 ng; 2, binding mixture containing ABF1 protein (1 μ g) and α -³²P-labelled ARS1 oligonucleotide (0.25 ng); 3-7, binding mixture contained 2, 5, 10, 20 and 50-fold molar excess of unlabelled ARS1 oligonucleotide, respectively.

돌연변이인 LEU-12 (L353R/L360R)는 당연히 DNA 결합능력이 사라지게 된 것이다.

Complementation test

YCA35 효모 세포에 각각의 mutant를 형질전환하여 25°C에서 colony가 나타날 때까지 키운 후에 37°C와 25°C로 온도를 높여서 배양한 결과, wild type만이 살아 남았다. 이 결과는 LEU-1 돌연변이만 제외하고 gel retardation 결과와 일치하였다 (Fig. 6). 즉 LEU-2 돌연변이는 DNA binding motif의 구조가 파괴됨으로 인하여 ABF1 단백질이 DNA에 결합하지 못하여 효모 세포가 살아 남을 수 없었다. 또한 ZINC 돌연변이도 동일한 결과를 얻었다. 이에 반해 LEU-1 돌연변이 단백질은 DNA에 매우 약하게 결합할 수 있으나 LEU-1 돌연변이가 형질전환된 세포는 다른 돌연변이와 같이 살 수 없었다. 온도 감수성 돌연변이인 YCA35에서는 LEU-1 돌연변이 단백질은 *in vitro*에서처럼 DNA에 매우 약하게 결합은 할 수 있으나, 안정하게 결합하지 못하기 때문에 ABF1의

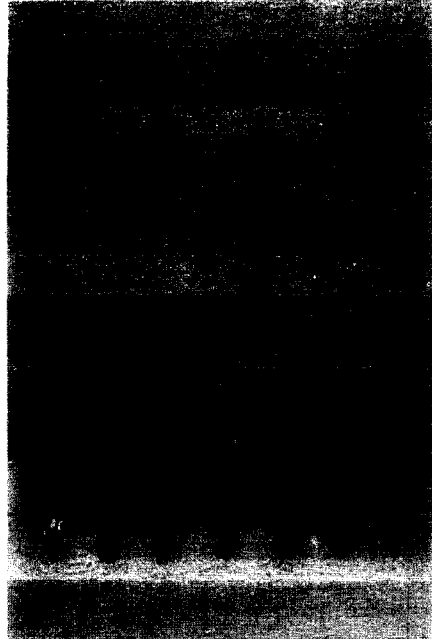


Fig. 5. DNA-protein binding analysis of each other mutants.

Gel retardation analysis was performed with an α -³²P-labelled ARS1 B3 element oligonucleotide in mutants. 1, free labelled oligonucleotide (ARS1) 0.25 ng; 2, binding mixture containing ABF1 protein (1 μ g) and α -³²P-labelled ARS1 oligonucleotide (0.25 ng); 3-6, binding mixture containing each other mutants, ZINC (H61A), LEU-1 (L353R), LEU-2 (L360R) and LEU-12 (L353R/L360R).



Fig. 6. Complementation of the thermosensitive *abf1-5* allele of *Saccharomyces cerevisiae* by plasmids containing the wild type and each mutant ABF1.

WT is YEp24-3a containing wild type ABF1. 1, YEp24-3a containing ZINC mutant; 2, LEU-1; 3, LEU-2; 4, LEU-12; 5, No YEp24-3a. Primary transformants was streaked out on minimal media and incubated at 37°C and 25°C.

다른 기능을 지닌 motif의 구조가 변경되지 않았다 하더라도 DNA 결합기능이 약해져서 complementation되지 않은 것으로 추정된다. 또한 약하게 결합된 LEU-1 돌연변이 단백질이 세포내에서 다른 기능, 즉 replication efficiency, transcription activation 과 repression들의 역할을 하는 구조가 변경됨으로 인하여 complementation되지 않을 가능성도 배제할 수는 없지만, 위와 같은 LEU-1과 LEU-2의 complementation의 결과는 353과 360 아미노산 지역에 다른 DNA binding motif가 존재한다는 것을 추정할 수 있는 증거가 되는 것이다. LEU-2의 DNA binding activity는 없는 것에 비해, LEU-1의 DNA binding activity가 약하게 나타나는 이유는 ABF1 protein의 397-416 아미노산 지역에 Helix-Turn-Helix motif가 존재하는데 (unpublished data), 아마도 이 부위에 360 아미노산보다 353 아미노산이 더 가까워서, LEU-2보다 LEU-1이 Helix-Turn-Helix motif에 약하게 영향을 미치기 때문으로 추정된다. ABF1 단백질의 DNA 인지지역은 RTCRYN₅ACG로 특히 TC, ACG는 여러 ABF1 인지부위에서 보존되는데 TC의 부위의 앞 뒤쪽의 염기 서열은 변화가 있는데 비해서 ACG는 정확하게 유지된다. 이 사실에 의하면 인지 부위가 두 부분으로 양분되어 있고 DNA binding motif도 두 부분으로 양분되어 있을 가능성이 있다. 이것은 본 실험의 결과와 일치한다.

그러므로 Zinc finger motif와 중간 지역의 DNA binding motif가 각각의 TC, ACG에 결합하는 것으로 추정되며, TC 지역에 zinc finger motif가 결합하는지 혹은 다른 DNA binding motif가 결합하는지는 알 수 없으나, phosphorylation과 같은 post-translational modification에 의하여 DNA binding motif의 구조가 변경됨으로 인하여 아마도 인지부위의 염기서열에 변이가 심한 TC지역에서 단백질의 상태에 따라 각 여러 ABF1 인지 염기서열부위의 결합정도가 달라질 것으로 추정된다.

감사의 글

본 논문은 1992년도 한국과학재단의 목적기초 연구과제와 세포분화 연구센터(92-4-3)의 연구 지원비로 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Brindle, P.K., J.P. Holland, C.E. Willett, M.A. Innis, and M. Holland, 1990. Multiple factors find the upstream activation sites of the yeast enolase genes ENO1 and ENO2; ABF1 protein, like repressor activator protein RAP1, binds *cis*-acting sequences which modulate repression or activation of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4827-4885.
2. Campbell, J., 1988. Eukaryotic DNA replication; yeast bares its ARSs. *TIBS* **13**, 212-217.
3. Chambers, A., C. Stanway, J.S.H. Tsang, Y. Henry, A. Kingsman, and S. Kingsman, 1990. ARS binding factor 1 binds adjacent to RAP1 at the UASs of the yeast glycolytic genes PGK and PYK. *Nucl. Acids Res.* **18**, 5393-5399.
4. Diffley, J.F.X. and B. Stillman, 1989. Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1. *Science* **246**, 1034-1038.
5. Dorsman, J.C., W.C. Jeesswijk, and L.A. Grivell, 1988. Identification of two factors which bind to the upstream sequences of a number of nuclear genes coding for mitochondrial proteins and to genetic elements important for cell division in yeast. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7287-7301.
6. Eigenberg, S., C. Civalier, and B.K. Tye, 1988. Specific interaction between a *Saccharomyces cerevisiae* protein and DNA element associated with certain autonomously replicating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 743-74.
7. Herruer, M.H., W.H. Mager, T.M. Doorenbosch, P.L.M. Wessels, T.M. Wassenaar, and R.J. Planta, 1989. The extended promoter of the gene encoding ribosomal protein S33 in yeast consists of multiple protein binding elements. *Nucl. Acids Res.* **17**, 7427-7439.
8. Hofmann, J.F.X. and S. Gasser, 1991. Identification and purification of a protein that binds the yeast ARS consensus sequence. *Cell* **64**, 951-960.
9. Halfter, H., U. Muller, E.L. Winnacker, and D. Gallwitz, 1989. Isolation and DNA binding characteristics of a protein involved in transcription activation of two divergently transcribed, essential yeast gene. *EMBO J.* **8**, 3029-3037.
10. Halfter, H., B. Kavety, J. Vandekerckhove, F. Kiefer, and D. Gallwitz, 1989. Sequence, expression and mutational analysis of BAF1, a transcriptional activator and ARS1-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **8**, 4265-4272.
11. Hamil, K.G., H.G. Nam, and H.M. Fried, 1988. Constitutive transcription of yeast ribosomal protein gene TCM1 is promoted by uncommon *cis* and *trans*-acting elements. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4328-4341.
12. Ito, H., Y. Fukuda, and A. Kimura, 1983. Transformation of intact yeast cell treated with alkali cation. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
13. Kellerman, O.K. and T. Ferenci, 1982. Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **90**, 459-463.
14. Kunkel, T.A., 1985. Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
15. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
16. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J.

- Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
17. Rhode, P.R., K.S. Sweder, K.F. Oegema, and J.L. Campbell, 1989. The gene encoding ARS-binding factor 1 is essential for the viability of yeast. *Gene & Development*. **3**, 1926-1939.
 18. Rhode, P.R., S. Elsasser, and J.L. Campbell, 1992. Role of multifunctional autonomously replicating sequence binding factor 1 in the initiation of DNA replication and transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1064-1077.
 19. Rine, J., J. Strathern, J. Hicks, and I. Herskowitz, 1979. A suppressor of mating type locus mutation of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for and identification of cryptic mating type loci. *Genetics* **193**, 837-901.
 20. Seta, D.F., I. Treich, J.M. Buhler, and A. Sentenac, 1990. ABF1 binding sites in yeast RNA polymerase gene. *J. Mol. Biol.* **265**, 15168-15179.
 21. Shore, D., D.J. Stillman, A.H. Brand, and K.A. Nasmyth, 1987. Identification of silencer binding proteins from yeast; Possible roles in SIR control and DNA replication. *EMBO J.* **6**, 461-467.
 22. Vignais, M.L., L.P. Woudt, G.M. Wassenaar, W.H. Mager, A. Sentenac, and R.J. Planta, 1987. Specific binding of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein gene. *EMBO J.* **5**, 1451-1457.

(Received February 16, 1994)

(Accepted February 24, 1994)

ABSTRACT: Structure-Function Analysis of DNA Binding Domain of the Yeast ABF1 Protein

Cho, Ginam, Sangkyung Lee², Hong Tae Kim, Ji Young Kim², Hyune Mo Rho¹ and Guhung Jung* (Department of Biology Education and ¹Department of Molecular Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, and ²Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea)

Autonomously replicating sequence Binding Factor 1(ABF1) is a DNA-binding protein that specifically recognizes the RTCRYN₅ACG at many sites in the yeast genome including the promoter element, mating-type silencer and ARS. To express the intact full-length ABF1 gene in *E. coli*, the ABF1 gene has been cloned into pMAL-c2 and His-61, Leu-353 and Leu-360 were substituted with other amino acid. ABF1 fusion proteins of wild type ABF1 and H61A, L353R and L360R mutants were purified by amylose resin affinity chromatography. Fusion protein of MBP and ABF1 was digested by Factor Xa and characterized by gel retardation assay and complementation test. As a result, we suggested that other DNA binding motif except atypical zinc-finger motif is in the middle region of ABF1.