

대장균 리보스 결합단백질의 신호배열 변이에 대한 속성체 부위의 회복돌연변이

이영희^{1,2} · 송택선¹ · 김정호¹ · 박순희^{2*} · 박찬규¹

¹ 한국과학기술원 생물공학과

² 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

Intragenic Suppressors for Export-defective Signal Sequence Mutation of Ribose-binding Protein in *Escherichia coli*

Lee, Younghee^{1,2}, Taeksun Song¹, Jeongho Kim¹, Soonhee Park^{2*} and Chankyu Park¹

¹ Dept. of Biological Science and Engineering, KAIST

² Cell Biology Lab., Genetic Engineering Res. Ins., KIST

ABSTRACT: A mutational alteration in the signal sequence of ribose-binding protein(RBP) of *Escherichia coli*, *rbsB103*, completely blocks the export of the protein to the periplasm. Intragenic suppressors for this mutation have been selected on minimal medium with ribose as a sole carbon source. Six suppressor mutations were characterized in detail and were found to have single amino acid substitution in the mature portion of RBP, which resulted in the mobility shift of the proteins on SDS polyacrylamide gel. Amino acid changes of these suppressors were localized in several peptides which are packed to form the N terminal domain of typical bilobate conformation of RBP. The involvement of SecB, a molecular chaperone, was investigated in the suppression of signal sequence mutation. Translocation efficiency was found to be increased by the presence of SecB for all suppressors. It is likely that the folding characteristics of RBP altered by the suppressor mutations affect the affinity of interaction between SecB and RBP.

KEY WORDS □ Intragenic suppressor, Ribose-binding protein, Protein export, *E. coli*, SecB

생명체가 가지고 있는 유전정보는 최종적으로 단백질로 발현되고, 생성된 개개의 단백질은 고유의 위치에서 기능을 발휘하게 된다. 진핵세포에서의 소포체, 핵, 미토콘드리아, 엽록체와 원핵세포에서의 세포막간, 세포외막에서 일어나는 단백질의 수송은 각 부위의 기능을 유지하는 데 필수적인 과정으로 많은 연구가 진행되고 있다(Randall 등, 1987).

막을 통과하는 단백질에는 신호배열이 존재하며, 막을 통과한 후에는 신호배열절단효소(또는 속성화효소)에 의해 잘려진다. 신호배열의 역할은 다양하게 제시되고 있는데, 단백질의 접힘(folding)을 늦춘다는 보고(Park 등, 1988)와 결합을 가진 신호배열에 대한 회복돌연변이가 막단백질에서 발견된 사실(Emr and

Hanley-Way, 1981)이 그 복합적인 기능을 암시한다. 즉, 생체막과 단백질의 상호작용을 유도하는 단계와 막통과 단계에 모두 관여하리라는 예측이 가능하다. 한편, 단백질의 막수송에는 여러 인자가 관여한다고 알려져있다. 대장균에서는 분자의 견인체 또는 보조자(chaperone)로 불리며 접힘을 지연시키는 SecB(Collier 등, 1988), ATPase 활성을 가지고 있는 SecA(Lill 등, 1990), 막에 존재하며 전위차(translocator)의 역할을 하는 것으로 보이는 SecY/E(Akiyama 등, 1990), SecD/F(Gardel 등, 1990) 등이 필요함이 유전학적 연구에 의하여 제시되고, 생화학적인 실험결과에 의해 그 기능이 밝혀지고 있다.

대장균의 세포막간에 존재하는 리보스 결합단백질(ribose-binding protein, RBP)은 리보스 수송과 주화성에 관여하는 단백질로서, 리보스 최소배지(0.05%)

*To whom correspondence should be addressed.

에서의 성장과 0.25% 한천배지에서 군환(swarm ring)을 형성하는데 주요한 역할을 한다. RBP 신호배열의 소수성 중심부 (hydrophobic core) 에 도입된 *rbsB* 103 돌연변이는 이 단백질의 수송을 완전히 막아 제 기능을 수행하지 못하게 한다. 그러므로, *rbsB*103 돌연변이를 가진 균주는 리보스 최소 배지에서 성장할 수 없다(Lida 등, 1985).

본 연구에서는 대장균의 *rbsB*103 돌연변이에 대한 회복돌연변이들을 분리하여 이들의 변화를 결정하였으며 돌연변이가 단백질의 수송에 미치는 영향과 단백질 삼차구조 내에서의 위치를 분석하였다. 아울러 수송 단백질의 folding에 있어서 chaperone 역할을 하는 SecB 단백질과의 상호작용 가능성도 제시하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

사용 균주는 모두 *Escherichia coli* K12이다. 주화성 실험에는 운동성이 좋은 OW1에서 유도된 균주를 사용하였다. 단백질 수송 양상을 확인하는 실험에는 일반적으로 널리 사용되고 있는 MC4100 계열의 균주를 사용하였다(Table 1).

리보스 결합단백질의 유전자인 *rbsB*를 가진 플라스미드로는 pAI12에서 유래한 것이 이용되었다. pAI12 계열은 *rbsB*, *rbsK*를 지니고 있으므로 염색체 상의 *rbsB* 유전자가 *rbsB::Tn10(rbsB-, rbsK-)*으로 불활성

화된 균주에서 다루어졌다. 돌연변이는 그 위치와 변이를 함께 써서 표시하였다.

배지, 시약 및 효소

LB 배지, tryptone broth(TB), M9 최소 배지는 Miller(1972)의 방법에 의해 만들어졌다. H1 최소 배지는 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 1 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 1 μM Fe₂(SO₄)₃를 포함하였으며 0.01% 비타민 B1, 1 mM 아미노산, 0.2% 포도당, 0.2% 또는 0.05% 리보스, 0.4% 글리세롤을 각각 필요에 따라 첨가하였다. 항생제를 사용할 경우 chloramphenicol 30 μg/ml, ampicillin 50 μg/ml, tetracycline 15 μg/ml의 농도를 유지하였다. Minimal swarm plate에는 0.1 mM 리보스가 포함되었다(Park 등, 1990). 모든 시약은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

제한효소 및 T4 ligase, T4 polynucleotide kinase는 제철화학에서 구입하였다. DNA sequencing에는 United States Biochemical Co.에서 구입한 T7 polymerase kit가 이용되었다. [³⁵S] ATP는 Amersham에서 구입하였다. 펄스 표지(pulse labeling)에는 [³⁵S] methionine(Amersham)을 이용하였다.

회복돌연변이 선별

회복 돌연변이체가 *rbsB*103 돌연변이를 지닌 균주보다 리보스 최소배지에서 성장속도가 빠른 것을 이용하여 분리를 시도하였다. 염색체상에는 *rbsB::Tn10*

Table 1. *Escherichia coli* strains and plasmids

Strains/plasmids	Genotype	Origin
Strains		
AI179	UH889/pAI12	S. Park
AI287	UH889/pAI27	S. Park
CP626	MC4100 <i>flbB</i> ⁺ <i>rbsB::Tn10</i>	C. Park
HO7	UH889/pHO7	J. Kim
MC4100	<i>araD139 D(lac)U169 strA thi flbB</i>	Laboratory collection
MM152	MC4100 <i>zhe::Tn10 malT secB::Tn5</i>	"
OW1	<i>his leu thr rpsL thi lac xyl ara tonA tsx</i>	"
TS6	UH889/pTS6	This study
TS7	UH889/pTS7	"
TS15	UH889/pTS15	"
TS21	UH889/pTS21	"
TS38	UH889/pTS38	"
UH889	<i>minA minB rpsL mgl(?) recA rbsB102::Tn10</i>	Laboratory collection
Plasmids		
pACYC184	<i>cat</i> ⁺ <i>tet</i> ^r	Laboratory collection
pAI12	pACYC184 <i>rbsB</i> ⁺ <i>rbsK</i> ⁺	Lida et al. (1984)
pAI27	pAI12 <i>rbsB</i> 103	"
pHO7	pAI27 <i>rbsB</i> 201	J. Kim
pTS6	pAI27 <i>rbsB</i> 202	This study
pTS7	pAI27 <i>rbsB</i> 207	"
pTS15	pAI27 <i>rbsB</i> 215	"
pTS21	pAI27 <i>rbsB</i> 221	"
pTS28	pAI27 <i>rbsB</i> 238	"

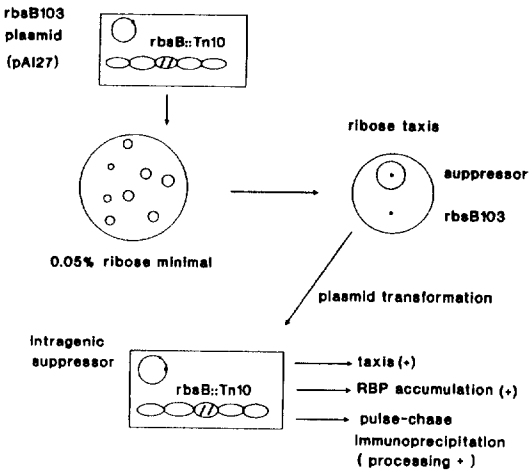


Fig. 1. Isolation of suppressors for the *rbsB103* signal-sequence mutation.

을 가지고 플라스미드 상에는 *rbsB103* 돌연변이 유전자를 지니고 있는 균주 AI287(Table 1) 은 0.05% 리보스 최소배지에서 성장이 미약하다. 또한 세포막 간에 RBP가 발견되지 않으며 리보스에 대한 주성을 보이지 않는다. 한편, 세포질 내에는 전구체 RBP가 축적됨으로 보아 유전자 발현은 정상적이나 *rbsB103* 돌연변이에 의해 RBP의 분비가 이루어지지 않음을 알 수 있었다(Iida 등, 1985).

AI287을 TB에서 하룻밤 동안 키운 뒤 등장액으로 씻고 0.05% 리보스 최소배지에 도달한 뒤 5일에서 7일 동안 배양하여 성장을 회복한 균주를 얻었고 이 중 1 mM 리보스를 포함한 0.25%의 한천배지에서 주화성을 보이는 균락을 골랐다. 이들 균주로부터 플라스미드를 분리한 후 *rbsB::Tn10*을 지니고 있는 균주 UH889 에 형질전환하여 동일한 회복양상을 보이는 것을 선택하였으며 RBP 유전자에 회복돌연변이가 일어난 것(intragenic suppressors)을 선별하였다(Fig. 1).

주화성 확인(swarm plate assay)

리보스에 대한 주화성은 리보스 최소 swarm 배지에 단일 집락에서 얻은 세포를 작은 점모양으로 접종하고 이를 35°C에서 16-24 시간 배양하여 생기는 군환(swarm ring)의 형성 여부로서 조사하였다(Park 등, 1990).

저온 삼투충격 및 SDS 젤 전기영동

각 회복균주를 TB 배양액에서 낮은 대수기까지 배양하였으며 변형된 Heppel의 방법(Neu and Heppel, 1965)으로 세포막간액을 얻었다. 고장액에서 저장액으로 옮김으로써 발생하는 삼투압의 차를 이용한 이 방법은 세포외막에 손상을 줌으로써 세포막 간의 단백질만을 주로 얻을 수 있게 한다. 2.5×10⁹ 세포를 원심분리한 후, 10 mM Tris, 30 mM NaCl 용액으로 두 번 씻었다. 침전물을 0.2 ml 의 30 mM

Tris(pH 7.0) 용액에 녹이고, 0.2 ml 의 30 mM Tris, 40% sucrose 용액과 4 μl 0.01 M EDTA 를 넣은 후 가끔 흔들며 주면서 상온에서 10분간 두었다. 2분간 원심분리한 후 침전물을 0.5 ml 의 차가운 0.5 mM MgCl₂ 용액에 재빨리 녹인 후 얼음에 10분간 두면서 가끔 흔들어 주었다. 2분간 원심분리하고 상층액을 취하여 12% SDS-polyacrylamide 젤 상에 전기영동 하였다.

펄스 표지와 면역 침전

적절한 항생제가 첨가된 TB에 세균을 접종하여 하룻밤 동안 키운 후, 0.4% glycerol을 포함한 M9 최소배지에서 1/50 비율로 희석, 접종하고 다시 하룻 밤 동안 배양하였다. 새로운 M9 최소배지 3 ml에 1/100으로 희석, 접종하여 중간 대수기까지(O.D. at 560 nm=0.4) 키웠다. 30 μCi/ml의 [³⁵S] methionine으로 1분간 펄스 표지하고 표지가 없는(cold) methionine(1 mM)을 포함한 M9 배지를 1:1 비율로 첨가하였다. 각 시간별로 배양액 800 μl를 따서 TCA (10%) 700 μl를 미리 넣어둔 eppendorf tube에 옮겨 반응을 정지시키고 동시에 침전시켰다. 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 얻고 0.5 ml acetone으로 씻었다. 침전을 50 μl의 10 mM Tris.Cl(pH 7.5), 1 mM EDTA, 1% SDS 용액에 현탁시키고 4 분 동안 끓여 용해시켰다. 5분간 원심분리하고 상층액 40μl를 따서 1 ml Triton buffer (50 mM Tris[pH 8.0], 0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 2% Triton X-100)에 옮긴 후 항 RBP 혈청(김 등, 1989) 20 l를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 두었다. 5분간 원심분리하여 침전을 얻고 150 μl의 0.5 M NaCl 용액(0.5 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Tris[pH 8.0], 5 mM EDTA, 0.1% SDS)을 넣고 격렬하게 흔들어 침전을 세척하였다. 다시 원심분리하여 침전을 얻고, 10 mM Tris(pH 8.0) 150 μl로 반복하여 세척하였다. 이어서 원심분리하여 상층액을 제거하고 20μl sample buffer를 넣어 vortex한 뒤 3분간 끓인 후 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동을 수행하고 autoradiogram을 얻었다. 분석에는 β-scan을 이용하였으며, scintillation counting으로 확인 측정하였다.

염기배열 결정

Polyethylen glycol(PEG) 방법을 이용하여 각 회복균주로부터 플라스미드를 순수 분리하고 (Sambrook 등, 1989), T7 polymerase kit를 이용한 Sanger 등(1977)의 dideoxy 방법으로 돌연변이의 위치와 변화를 확인하였다. sequencing primer는 oligonucleotide synthesizer를 이용하여 합성했으며 300 염기상의 간격으로 전체 *rbsB*의 서열을 읽을 수 있게 하였다.

단백질 삼차구조 분석

RBP 삼차구조의 도시 및 분석에는 Cray-2S 슈퍼 컴퓨터에 연결된 IRIS Graphic Workstation이 이용되었으며, pdb(protein data bank) 형식으로 기록된 RBP의 coordinate를 INTERNET을 통하여 S. Mowbray로부터 제공받았다(Howard Hughes Medi-

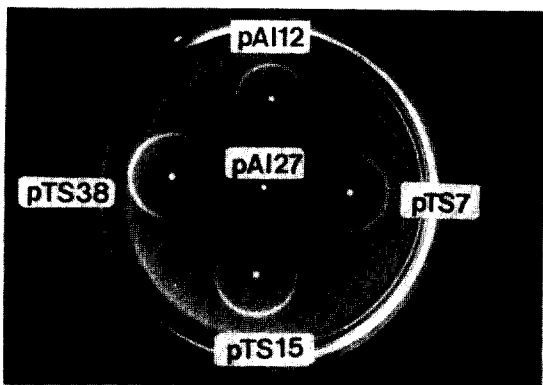


Fig. 2. Tactic phenotypes of the suppressors isolated for *rbsB103* on ribose swarm plate. The plasmids harboring wild type *rbsB*(pAI12), *rbsB103*(pAI27), or one of the suppressors were transformed into OW1 *rbsB::Tn10* and the transformants were tested. The strains containing the plasmids, pTS7, pTS15, or pTS38 were compared with the strain containing wild type(pAI12) or *rbsB103*(pAI27) plasmid.

cal Institute, Texas, unpublished data).

수송 회복에 미치는 SecB의 영향 분석

신호배열의 수송 결함에 대한 억제 기작과 SecB와의 관련성을 조사하기 위해 염색체 상에 secB::Tn5를 도입하여 SecB가 불활성화된 균주를 만들었다. 이를 위해 MM152(secB::Tn5)에서 얻어진 P1 lysate로써 형질도입이 수행되었다.

secB+ 또는 secB::Tn5를 지닌 두 가지 균주에 회복 돌연변이 플라스미드를 각각 형질전환시키고, 펄스 표지와 면역 침전을 수행하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 이들의 autoradiogram을 얻어서 RBP의 수송 정도를 관찰, 비교하였다. 즉, 숙주체 RBP와 전구체 RBP 양을 β-scan을 이용하여 측정하였으며, 이를 백분율로 나타내었다.

결 과

수송회복 돌연변이의 선별

야생형 *rbsB*와 신호배열 돌연변이 *rbsB103*를 지닌 균주가 성장에 있어 명확한 차를 보이는 0.05% 농도를 선택하여 Fig. 1에 제시한 모식도에 따라 회복균주의 선별을 시도한 결과 *rbsB* 유전자 내에 회복돌연변이를 가진 균주를 70 여개 얻을 수 있었다. 회복돌연변이가 *rbsB* 유전자 내에 존재하는지 다른 수송에 관여하는 유전자에 위치하는지를 알기 위해 회복균주로부터 플라스미드를 얻고 *rbsB102::Tn10*으로 *rbsB* 유전자가 불활성화되어 있는 UH889균주에 형질전환시켜 회복 양상이 반복되는 것을 확인하였다. 이때 형질전환체의 80%가 리보스에 대해 주화성을 보였는데 이로써 원래의 회복균주에는 *rbsB103*형과 회복형의 플라스미

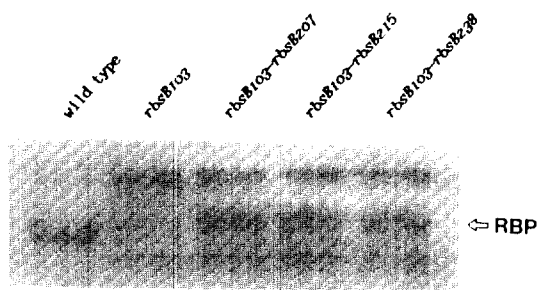


Fig. 3. Export of RBP into the periplasm in strains harboring suppressors for *rbsB103*. The amount of sample loaded for the wild type was one fourth of the others. The plasmids, pTS7, pTS15 and pTS38 carry *rbsB207*, *rbsB215* and *rbsB238* alleles, respectively.

드가 섞여있었음을 알 수 있었다. 이들 회복균주 중에서 TS6, TS7, TS15, TS21, TS38, HO7(김 등, 1989)을 무작위로 선택하고, 이들이 가지고 있는 플라스미드를 각각 pTS6, pTS7, pTS15, pTS21, pTS38, pHO7으로 명명한 다음 이들 플라스미드가 가지고 있는 회복돌연변이에 대한 분석을 수행하였다.

회복돌연변이주의 주화성 측정

*rbsB103*는 RBP의 수송을 완벽하게 저해하므로 리보스 swarm plate에서 ring을 형성하지 못한다. *rbsB103*에 대한 회복돌연변이들이 주화성에 미치는 영향을 측정하였다. 이들은 주화성을 회복시켜주었으며 ring의 크기는 다양했다. 회복돌연변이의 경우 야생형에 비해 ring이 큰 것이 대부분이었다. 이 중 회복돌연변이 플라스미드 pTS7, pTS15, pTS38과 야생형, *rbsB103* 돌연변이 균주에 대해 Fig. 2에서와 같이 주화성 표현형을 관찰하였다.

회복돌연변이주에서 생산되는 RBP의 분석

삼투충격을 이용하여 세포막간에 존재하는 단백질을 얻고 SDS-PAGE로서 분리, 분석하였다. *rbsB103*형의 RBP를 가지고 있는 균주의 경우 세포막간에 RBP가 전혀보이지 않은 반면 회복형의 경우에는 다양한 수준의 RBP가 측정되었으며 야생형과 비교하면 50% 이하가 대부분이었다. 이들 중 SDS 켈상에서 RBP의 이동성이 감소하는 양상을 보여주는 회복형도 존재하였다. 이 중 일부를 야생형, *rbsB103* 돌연변이형과 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 막을 통과한, 즉 신호배열이 이미 잘려진 상태에서 이러한 변화가 있다는 것은 단백질 숙주체 부분에 돌연변이가 존재함을 의미하므로, 이들을 먼저 선택하여 실험하였다. Fig. 3에서 삼투충격 실험을 수행한 회복돌연변이들에 대해 펄스 표지 실험을 수행하였다(Fig. 4). 그 결과를 보면 suppressor들의 수송결함 억제현상을 분명하게 관찰할 수 있으며, 단백질 합성 직후의 processing이 특히 두드러지는데 비해 수신편이 경과한 후에는 반응이 느려져 포화되는 특성을 보여주었다.

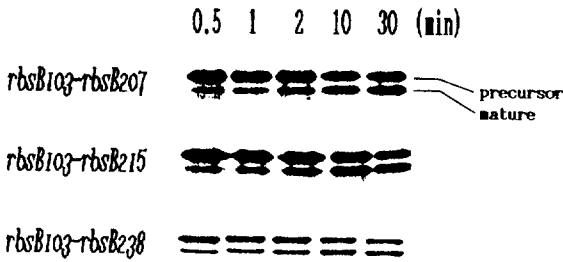


Fig. 4. Translocation kinetics of the *rbsB103* suppressors determined by pulse-chase labeling and immunoprecipitation. The values labeled on the top indicate the time for chase after pulse-labeling.

회복돌연변이들의 염기배열 결정

*rbsB103*에 대한 회복돌연변이체 중 SDS-PAGE 상에서 이동성의 변화를 보이는 6 개의 회복돌연변이에 대해 염기배열을 결정하고 이미 알려진 *rbsB* 유전자의 염기배열과 비교하여 변이된 부분을 확인하였다. 이들 변이로 인해 유발되는 아미노산의 변화를 Table 2에 제시하였다. 회복돌연변이는 27,36,50 번째의 세 잔기에 집중되었다. 3 개의 회복돌연변이 (*rbsB202*, *rbsB215*, *rbsB221=rbsB27AT*)가 동일한 돌연변이로서 숙성체의 N 말단에서 27 번째에 위치하는 alanine이 threonine으로 바뀌었고, 동일 위치에 glycine으로 바뀐 것(*rbsB207=rbsB27AG*)이 또 하나 확인되었다. 편의상 회복돌연변이는 그 위치와 변화로써 표시하기로 한다.

RBP의 2차 및 3차 구조상에서의 회복돌연변이 위치 분석

돌연변이가 일어난 위치인 27번, 36번, 50번 잔기는 RBP 2차 구조 상에서 N 말단쪽에 편재되어 있었다. 즉, N 말단에서 시작하여 첫번째 형성되는 나선과 가닥, 두번째 나선 중앙에 존재한다(Fig. 5).

한편, 최근에 밝혀진 X선 회절 분석 결과(S. Mowbray, personal communication)에 따르면, RBP는 기능적으로 유사한 당결합 단백질인 arabinose-binding protein(ABP), galactose-binding protein(GBP)의 구조와 유사하게 N 말단 쪽의 peptide들이 만드는 domain(N domain)과 C 말단

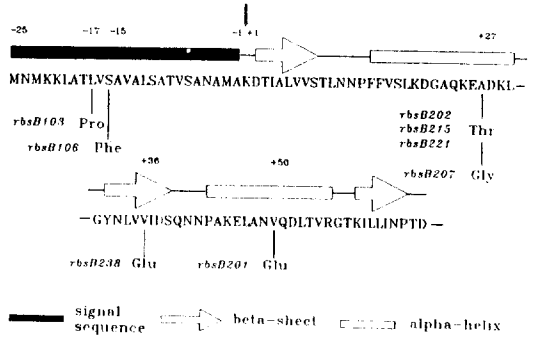


Fig. 5. The primary and secondary structure of N-terminal region of ribose-binding protein where *rbsB103* signal sequence mutation and the suppressors were localized. The arrow among amino acids labeled -1 and +1 indicates the processing site of precursor protein.

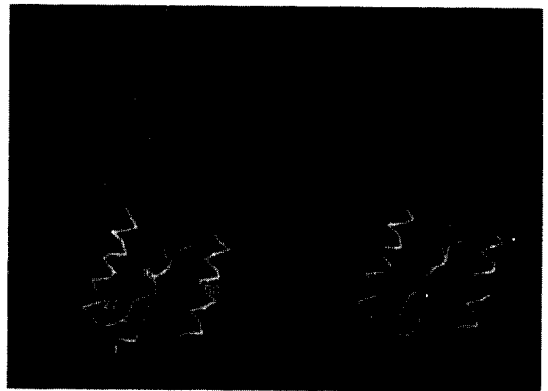


Fig. 6. Localization of the suppressors on the N-domain in the tertiary structure of RBP. The wild type RBP structure was analyzed by X-ray crystallography at the resolution of 2.6 (S. Mowbray, personal communication). Location of the suppressors was visualized on the alpha-carbon backbone of RBP.

쪽의 peptide로 이루어진 또 하나의 domain(C domain)으로 구성되어 있다. 3차 구조상에서 RBP

Table 2. The changes of the suppressor mutations for *rbsB103*

Suppressor	Position	Base change	Amino acid change
<i>rbsB202</i>			
<i>rbsB215</i>	+ 27	GCG-ACG	Ala-Thr (<i>rbsB27AT</i>) ^a
<i>rbsB221</i>			
<i>rbsB207</i>	+ 27	GCG-GGG	Ala-Gly (<i>rbsB27AG</i>)
<i>rbsB238</i>	+ 36	GTG-GAG	Val-Glu (<i>rbsB36VE</i>)
<i>rbsB201</i>	+ 50	GTG-GAG	Val-Glu (<i>rbsB50VE</i>)

^aThe names of alleles in parenthesis were used in this paper.

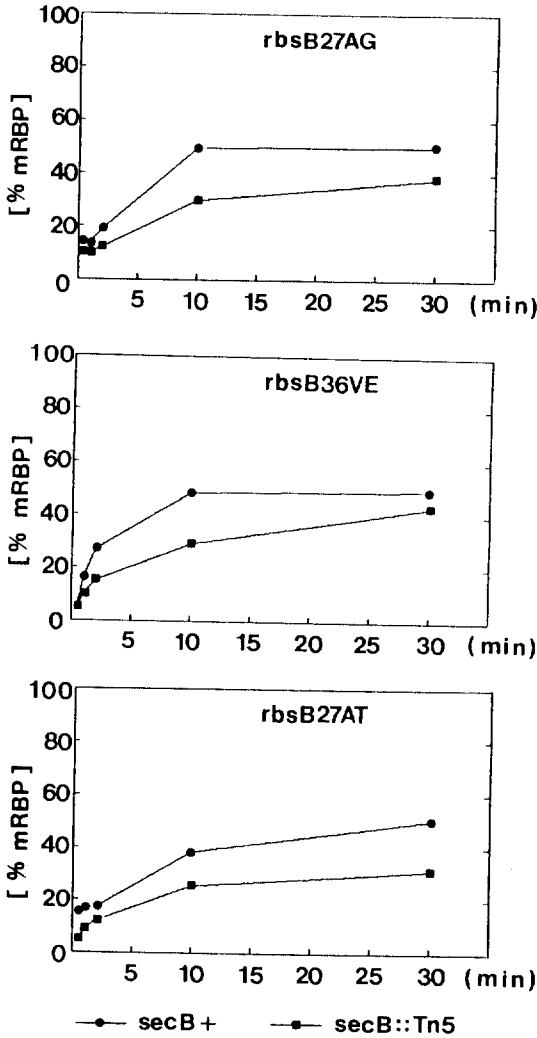


Fig. 7. Effect of SecB on the suppression of rbsB103 phenotype. The plasmid containing a suppressor was transformed into the strain which has wild type secB or secB::Tn5 and the suppression phenotype was examined by pulse-chase experiment. The values on X-axis indicate the time of chase after pulse-labeling and those on Y-axis indicate the proportion of mature RBP to all RBP species, i.e., mature and precursor RBPs.

회복돌연변이들의 위치를 분석한 결과 N domain에 편재되어 있으며 옆에서 보면 하나의 평면 상에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 6).

수송 회복돌연변이에 미치는 SecB의 영향

단백질 수송기구로서 분자의 견인체(molecular chaperone)의 하나로 알려져 있는 SecB는 maltose-binding protein(MBP) 등의 접합을 지연시키는 기

능을 가지고 있다(Collier 등, 1988). RBP 회복돌연변이에 대한 SecB의 영향을 관찰하고자 방법편에 기술한 대로 균주를 제조하고 펄스 표지 및 면역 침전을 수행한 후 수송된 숙성체 RBP 양과 수송되지 않은 전구체 RBP 양을 측정하였다. 야생형 SecB가 있는 균주들에서 얻은 결과와 secB::Tn5가 있는 균주에서 얻은 결과를 각각 %로 환산하고 이를 Fig. 7에 나타내었다.

신호배열에 rbsB103를 가지면서 숙성체에 세 가지 회복돌연변이 rbsB27AG(Fig. 7a), rbsB27AT(Fig. 7 b), rbsB36VE(Fig. 7c) 중 하나를 가진 균주에서 SecB의 영향을 본 결과 이들 모두에서 수송회복에 SecB의 영향이 있음을 알 수 있었다.

고찰

친수성을 띤 단백질이 소수성의 생체막을 통과하는 것은 생체가 보여주는 또 하나의 정교한 기작으로, 단백질 수송에 관여하는 여러 인자들이 유전학적 연구에 의해 제시되었으며 생화학적 연구와 병행하여 논의가 진전되고 있다.

당 결합 단백질로서 단백질 수송에 대해 많이 연구되어온 MBP는 기능적으로 RBP와 유사하지만 수송기작에 있어서 많은 차이점을 보여주고 있다(Randall 등, 1987). 즉, RBP의 경우에는 MBP와는 달리 단백질 합성이 끝난 후에야 비로소 막을 통과할 뿐만 아니라 SecB와 무관하다고 알려져 왔다. 최근에 알려진 RBP와 MBP의 삼차구조는 수송기작에 있어서 차이점에 대한 논의의 실마리를 제공할 수도 있을 것이다.

rbsB103는 RBP의 신호배열에 도입된 돌연변이로서 단백질 수송을 거의 억제하므로 이에 대한 회복돌연변이의 선별이 용이하였다. RBP 숙성체에 회복돌연변이를 가지고 있는 여섯 개의 회복돌연변이를 분석한 결과 이들 중 네 개가 동일한 위치(27번 alanine)였고 그 중 세 개가 동일한 변화였음(alanine→threonine)은 주목할 만한데, 이들이 독립적으로 일어났다는 사실로 미루어 볼 때, 27번의 아미노산이 RBP의 수송을 위한 단백질 구조에 크게 기여하고 있는 것으로 여겨진다.

X선 회절 분석으로 밝혀진 구조에서 이들 회복돌연변이의 위치를 살펴볼 때 RBP의 두 domain 중 N domain의 한쪽에 치우쳐 있으며, 특히 한 평면 상에 존재함은 흥미로운 사실이다. 이는 수송과정에서 존재할 수 있는 특별한 상호작용에 이 부위가 참여하고 있을 가능성을 제시한다.

한편, 이들 회복돌연변이들이 단백질의 접합에 미치는 영향을 분석하고자 tyrosine 잔기의 형광성을 이용하여 단백질의 접합을 추적하였을 때 이들 회복돌연변이는 RBP의 접합속도를 현저히 늦추는 것을 확인할 수 있었다(Teschke 등, 1991). 회복돌연변이만이 남아있는 숙성체의 경우에도 여전히 접합의 속도가 15 배 가량 감소한다는 사실은 단백질의 접합에

있어 회복돌연변이는 독자적인 기능을 수행하는 것으로 추정할 수도 있다. N 말단의 몇 개의 peptide가 독자적인 구조를 형성하여 접힘이 늦추어지면 이에 의해 단백질 수송기구와 상호작용할 가능성과 기회를 증가시켜 수송이 가능한 형태가 오래 유지될 수 있을 것이다. 이들 두 가지 가능성은 복합적으로 작용할 수도 있을 것이다.

이와 같은 기작들에 의해 상호 작용을 하게된 단백질 수송 기구로서 분자의 견인체로 알려져 있는 SecB를 생각할 수 있다. SecB는 RBP의 수송에 무관하다(Randall, 1987)고 알려져 있으나 이는 야생형에서만 확인된 사실이며 상호작용을 가능하게 하는 RBP의 구조가 돌연변이에 의해 형성된다면 그 영향을 배제하기 어려울 것이다. 특히 MBP의 경우 접힘의 성질에 변화가 일어났을 때 SecB에 대한 친화도가 변화하였음이 보고된 바 있고(Weiss and Bassford, 1990), extragenic suppressor가 존재할 경우 RBP의 수송이 SecB의 영향을 받음이 관찰되었다(김 등, 보고되지 않은 결과). 만약 SecB가 관련된다면, 수송 기작이 우회될 수도 있을 것이다. 이를 확인하기 위해 secB::Tn5로 SecB가 불활성화된 균주를 만들고 회복형 RBP 플라스미드를 형질전환시켜 회복 양상에 영향이 있는지 관찰하였다. 균환을 살

펴보면 큰 차이는 없는 것으로 보이거나 삼투충격 및 pulse-chase로 확인한 결과 SecB가 수송 회복에 기여함을 알 수 있었다. 그러나 그 기여도는 크지 않았다. 이미 회복돌연변이에 의해 접힘 지연이 충분히 유도된 상태이므로, 접힘을 지연시킨다고 알려진 SecB가 회복돌연변이의 수송 회복에 크게 기여하지 않은 것으로 보인다. 따라서, SecB가 야생형 RBP와는 작용하지 않는다는 이전의 보고와는 달리 숙성체에 회복돌연변이를 가진 RBP에 있어서는 상호작용이 일어남을 알 수 있었으며, 이는 아마도 회복돌연변이에 의한 접힘 성질의 변화에 기인하는 것으로 추측된다. 한편, 세포내막을 여러번 횡단하는 단백질인 PrlA는 분비단백질이 통과하는 통로일 가능성이 큰 것으로 보이며 PrlA 수준에서 수송회복이 이루어진다면 이는 신호배열과 숙성체 부위의 상호작용에 의해 만들어지는 부분적인 구조가 통과에 필요조건으로 작용할 수 있을 것이다. 따라서 PrlA를 포함한 여러 수송 인자와의 관련성은 extragenic suppressor의 연구와 함께 계속 확인되리라 생각된다. 또한, 부위 특이적 돌연변이를 이용하여 다양한 신호배열의 돌연변이를 얻고 이에 대한 새로운 종류의 회복돌연변이를 찾는다면, 구조적 관점에서 단백질 수송을 추적해 보는 시도가 가능할 것이다.

적 요

대장균의 리보스 결합단백질(ribose-binding protein, RBP)의 수송에 결합을 주는 *rhsB103* 신호배열 돌연변이는 이 단백질이 세포막간으로 수송되는 것을 완전히 봉쇄하여 0.05% 리보스 최소배지에서의 성장을 억제한다. 이 리보스 최소배지로부터 성장이 회복된 70여개의 회복돌연변이주를 분리하고 이들 중 유전자내 회복돌연변이주(introgenic suppressor)를 여섯 개 선택하여 분석하였다. 이들 회복돌연변이주에서 생산된 RBP를 SDS-polyacrylamide gel 상에서 분석한 결과 숙성체 단백질의 이동 속도가 변한 것을 알 수 있었다. 각 회복돌연변이를 지닌 유전자의 염기배열을 결정된 결과 숙성체 부위에 있어서 아미노산 치환 돌연변이가 발견되었다. 이들 여섯 개의 회복돌연변이에서 변화된 아미노산은 리보스 결합단백질의 삼차구조 상에서 모두 N domain에 위치하였다. 한편, 다른 대장균 단백질의 수송에 관여하며, 견인체의 일종으로 알려진 SecB의 영향을 분석한 결과 회복돌연변이들의 수송 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 이는 숙성체내 회복돌연변이에 의한 folding의 변화가 SecB와의 상호작용을 유도하여 수송 능력을 증가시키는 결과로 추측된다.

사 사

본 연구는 과학 재단 목적 기초 연구비(L01381) 지원에 의한 것이다.

참 고 문 헌

1. 김 정호, 박 순희, 박 찬규, 1989. *Escherichia coli* K-12 리보스 결합단백질의 신호배열 돌연변이에 대한 복구돌연변이들. 한국생화학회지 제 22권, 479-486.
2. Akiyama, Y., T. Inada, Y. Nakamura and K. Ito, 1990. SecY, a multispansing membrane protein, contains a potential leader peptidase cleavage site. *J. Bacteriol.* 172: 2888-2893.
3. Collier, D.N., V.A. Bankaitis, J.B. Weiss and P.J. Bassford, Jr., 1988. The antifolding activity of

SecB promotes the export of the *E. coli* maltose binding protein. *Cell* 53: 273-283.

4. Emr, S.D. and S. Hanley-Way, 1981. Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23: 79-88.
5. Gardel, C., K. Jonson, A. Jacq, J. Beckwith, 1990. The *secD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* 9: 3209-3216.
6. Iida, A., S. Harayama, T. Iino and G.L. Hazelbauer, 1984. Molecular cloning and characterization of genes required for ribose transport and utilization in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 158: 674-682.
7. Iida, A., J.M. Groake, S. Park, J. Thom, J.H. Zabicky, G.L. Hazelbauer, and L.L. Randall, 1985. A signal sequence mutant defective in export of ribose binding protein and a corresponding pseudorevertant isolated without imposed

- selection. *EMBO J.*, **4**, 1875-1880.
8. **Lill, R., W. Dowhan and W. Wickner**, 1990. The ATPase of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell*, **60**, 271-280.
 9. **Miller, J.H.**, 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 11724.
 10. **Neu, H.C. and L.A. Heppel**, 1965. The release of enzyme from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplast. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3685-3692.
 11. **Park, C., D.P. Dutton and G.L. Hazelbauer**, 1990. Effects of glutamines and glutamates at sites of covalent modification of a methyl-accepting transducer. *J. Bacteriol.*, **172**, 7179-7187.
 12. **Park, S., G. Liu, T.B. Topping, W.H. Cover, L.L. Randall**, 1988. Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science*, **239**, 1033-1035.
 13. **Randall, L.L., S.J.S. Hardy and Julia R. Thom**, 1987. Export of protein: A biochemical view. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 507-541.
 14. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis**, 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 15. **Sanger, F., S. Niklen and A.R. Coulson**, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
 16. **Teschke, C.M., J. Kim, T. Song, S. Park, C. Park and L.L. Randall**, 1991. Mutations that affect the folding of ribose-binding protein selected as suppressors of a defect in export in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11789-11796.
 17. **Weiss, J.B. and P.J. Bassford, Jr.**, 1990. The folding properties of the *Escherichia coli* maltose binding protein influence its interaction with SecB *in vitro*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3023-3029.

(Received July 8, 1991)

(Accepted August 6, 1991)