

안지오제닌을 이용한 *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA의 고차원 구조 분석

金尙範 · 趙蓬來 · 任慈惠[†] · 張秀眞[‡] · 朴仁源^{*}

서울대학교 자연과학대학 화학과

[†]경기대학교 대학 화학과

[‡]충북대학교 대학 생화학과

(1994. 8. 8 접수)

Analysis of Higher Order Structure of 5S rRNA from *Xanthomonas celebensis* by Using Angiogenin

Sangbum Kim, Bongrae Cho, Jahei Ihm[†], Soo-Ik Chang[‡], and Inwon Park^{*}

Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

[†]Department of Chemistry, Kyunggi University, Suwon 440-760, Korea

[‡]Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

(Received August 8, 1994)

요 약. 우유에서 추출한 안지오제닌을 사용하여 *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA의 고차원 구조를 조사하였다. 안지오제닌은 5S rRNA의 단일가닥 부분에 있는 피리미딘 염기들의 먼 쪽으로 있는 3' P-O 에스테르 결합들만을 절단하였다. pH 7.0이고 10 mM의 Mg^{2+} 이 있을 때 안지오제닌은 5S rRNA의 d 고리에서만 작용하였지만 Mg^{2+} 이 없을 때는 e 고리를 제외한 모든 고리들(a, b, c, d 고리들)에서 작용하였다. Mg^{2+} 이 없을 때 $U_{74}-G_{75}$ 와 $U_{77}-A_{78}$, $U_{103}-A_{104}$ 결합들이 pH 7.0과 pH 3.5에서 모두 안지오제닌의 작용에 매우 민감하였다. 한편 pH 3.5이고 Mg^{2+} 이 없을 때 안지오제닌이 a 고리의 $C_{17}-G_{18}$ 과 b 고리의 $U_{55}-G_{56}$ 결합들을 강하게 절단하였다. 이러한 결과들에서 우리는 다음과 같이 결론을 내릴 수 있다. 첫째, 안지오제닌을 5S rRNA의 삼차구조 분석에서의 탐침의 하나로 사용할 수 있음을 알았다. 둘째, 5S rRNA의 d 고리의 구조는 Mg^{2+} 과 H^+ 농도에 따라 변하기 쉽다는 것을 알았다.

ABSTRACT. Higher order structure of 5S rRNA isolated from *Xanthomonas celebensis* was examined using angiogenic extracted from milk. Angiogenin cleaved exclusively 3' P-O bonds on the far sides of pyrimidines in the single-stranded sequences of 5S rRNA. Whereas angiogenin acted only on the loop d of 5S rRNA at pH 7.0 in the presence of 10 mM Mg^{2+} , it acted on all the loops (a, b, c and d) except loop e in the absence of Mg^{2+} . In the absence of Mg^{2+} , bonds $U_{74}-G_{75}$, $U_{77}-A_{78}$ and $U_{103}-A_{104}$ were highly susceptible to the action of angiogenin both at pH 7.0 and at pH 3.5. On the other hand, at pH 3.5 in the absence of Mg^{2+} angiogenin strongly cleaved the bond $C_{17}-G_{18}$ of loop a and the bond $U_{55}-G_{56}$ of loop b. The results lead us to the following conclusion. First, angiogenin can be used as one of the probes for the tertiary structure analysis of 5S rRNA. Second, the structure of loop d of 5S rRNA is variable depending on the concentrations of Mg^{2+} and H^+ .

서 론

최근에 우리는 *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA 분자내에서 일어나는 몇 가지 삼차상호작용을 분석

하여 보고하였다¹. 우리는 이 보고에서 *X. celebensis* 5S rRNA의 c 고리와 e 고리가 일정한 방법으로 a 고리와 삼차상호작용을 하며, b-C 구역과 D-d 구

역은 이 삼차상호작용을 위한 5S rRNA 분자의 접힘에서 돌쩌귀의 역할을 할 것이라고 제안하였다. 또한 우리는 *X. celebensis* 5S rRNA가 pH 5.5에서 c 고리에 있는 염기들이 C₃₆:A₄₆, C₃₇:A₄₅, C₃₈:G₄₄, A₃₉:C₄₃들의 염기쌍을 이룬다는 것을 알았다. 그러나 이미 보고한 연구에서는 5S rRNA를 용해한 완충용액에 Mg²⁺이 있을 경우와 없을 경우, 그리고 pH 변화가 있을 경우에 5S rRNA 분자의 b-C와 D-d 구역들 그리고 a, c, e 고리들에 있는 피리미딘 염기들의 3'쪽으로 있는 포스포디에스테르 결합들이 리보핵산 가수분해효소들에 대한 민감성이 어떻게 달라지는지를 조사하지 않았기 때문에 이 부분에서의 구조변화의 정확한 원인을 설명할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 우유에서 추출한 단백질인 안지오제닌을 사용하여 그 부분에 대한 분석을 보충하고자 하였다. 우리는 우유에서 추출한 안지오제닌이 RNA의 피리미딘 염기들의 3'쪽으로 있는 포스포디에스테르 결합을 특이하게 절단하는 활성을 가지고 있다는 것을 관찰하여 발표한 바 있다². 최근에 Rybak와 Vallee도 사람의 결장에서 정제한 안지오제닌이 5S rRNA들을 주로 피리미딘 염기들의 3'쪽으로 있는 포스포디에스테르의 결합들에서 특이하게 절단한다는 것을 보고하였다³.

실 험

안지오제닌의 정제. 우유에서의 안지오제닌의 정제는 소의 혈장에서 안지오제닌을 추출할 때 사용한 Bond와 Vallee⁴의 방법에 따라서 하였다.

5S rRNA의 추출과 정제. *X. celebensis* 세포를 영양우무배지에서 키운 후 거둔다. 5S rRNA는 페놀 추출법과 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 전기이동법으로 분리 정제하였다⁵.

5S rRNA의 말단의 표지. 5S rRNA의 5'-말단과 3'-말단의 ³²P-표지는 Koh 등⁶의 방법에 따라서 실시하였다.

안지오제닌을 사용한 5S rRNA의 절단 반응. 아래의 세 가지 복원 완충용액에 5' 또는 3' 말단에 ³²P-표지된 5S rRNA를 녹인 다음 이 용액을 60°C의 물중탕에 넣어 상온이 될 때까지 방치하여 복원시켰다(약 3시간이 소요된다).

사용한 복원 완충용액: 완충용액 A(50 mM 카코딜산 나트륨, pH 7.0, 10 mM 염화 마그네슘), 완충용액 B(50 mM 카코딜산 나트륨, pH 7.0, 1 mM EDTA), 완충용액 C(0.25 M 시트르산, pH 3.5). 각 완충용액에 녹인 5S rRNA 용액(3 μg 5S rRNA/μl) 2 μl에 안지오제닌 약 0.1 μg을 가하여 상온에서 20분 동안 반응시켰다.

절단된 위치들의 분석. 에탄올로 침전시킨 조각들을 동결건조시켜서 이것을 우레아-염료 완충용액에 다시 용해시킨다. 이 용액을 90°C에서 30초 동안 가열한 다음에 8.3 M 우레아를 포함하는 12% 폴리아크릴아미드 겔(30 cm×40 cm×0.05 cm)에서 전기이동으로 분리하였다⁶.

결과 및 고찰

pH 7.0의 용액에서 Mg²⁺ 이온의 유무가 안지오제닌의 절단자리에 미치는 영향. Fig. 1의 방사선 자동사진에서 N 줄은 완충용액 A(10 mM의 Mg²⁺이 있고, pH 7.0인 용액)에서 복원시킨 5S rRNA를 안지오제닌으로 처리하여 얻은 RNA 조각들을 분리한 모양이고 S 줄은 완충용액 B(Mg²⁺이 없고 pH 7.0인 용액)에서 복원시킨 5S rRNA를 안지오제닌으로 처리하여 얻은 RNA 조각들을 분리한 모양이다. 그 결과를 Fig. 3에 종합해서 나타내었다. 10 mM의 Mg²⁺이 있는 조건과 Mg²⁺이 없는 조건에서 모두 안지오제닌으로 절단되는 결합들은 U₇₄-G₇₅와 U₇₇-A₇₈ 그리고 U₁₀₃-A₁₀₄(Fig. 1에는 나타나 있지 않음)이다. 이 세 결합들은 거의 모든 5S rRNA 분자들의 경우 복원 완충용액에서 자발적으로 절단되는 자리들이기 때문에 안지오제닌의 작용을 민감하게 받을 것으로 기대되는 자리이다.^{1,7,8} pH 7.0인 조건에서 Mg²⁺이 있을 때는 안지오제닌으로 절단되지 않지만 Mg²⁺이 없을 때 절단되는 결합들은 C₁₄-A₁₅, C₂₇-C₂₈, C₃₈-C₃₉, C₄₃-C₄₄, C₆₈-G₆₉, C₇₁-G₇₂들인데, 이 결합들은 모두 단일가닥으로 된 a, b, c, d 고리들에 위치하고 있는 것이 특징이다(Fig. 3 참조). 이 결과는 자연상태의 5S rRNA 구조에서 이 결합들을 이루는 뉴클레오티드들이 같은 분자내의 다른 염기들과 삼차상호작용으로 묶여 있거나 삼차구조 상에서 안지오제닌이 접근할 수 없는 분자 내부에 깊숙히 묻혀

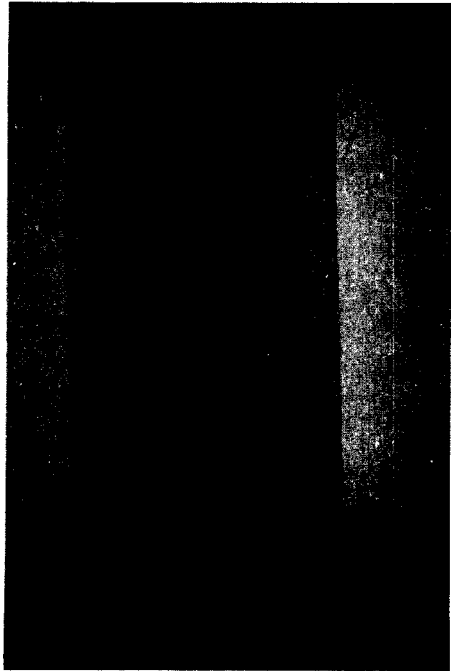


Fig. 1. Autoradiograph of 5'-end labeled *X. celebensis* 5S rRNA partially degraded with angiogenin and separated on a 12% polyacrylamide gel. 1 µg of [5'-³²P]-S rRNA was partially degraded at pH 7.0 and at room temperature for 20 min. Electrophoresis was carried out at 1200 V for 6 h (two on the left) and 3 h (right).



Fig. 2. Autoradiograph of 3'-end labeled *X. celebensis* 5S rRNA partially degraded with angiogenin and separated on a 12% polyacrylamide gel. 1 µg of [5'-³²P]-S rRNA was partially degraded at pH 3.5. Other conditions for hydrolysis of 5S rRNA are the same as described in Fig. 1. Electrophoresis was carried out at 1200 V for 8 h (left) 5 h (middle) and 3 h (right). C, control; OH, alkali ladder; T₁, RNase T₁ digestion; 0.1 and 0.01, 0.1 µg and 0.01 µg of angiogenin was used respectively.

있음을 암시하는 것으로 생각된다. 최근에 우리는 피로탄산 아에틸과 Fe(II)-EDTA를 사용하여 10 mM의 Mg²⁺이 있는 조건에서 5S rRNA의 a, b, c, d, e 고리들이 삼차상호작용에 관여한다는 것을 밝혔는데¹ 본 연구결과도 이 관찰이 옳았음을 확인해주는 것으로 생각된다.

안지오제닌에 의한 절단의 염기 특이성. 위에서 본 바와 같이 안지오제닌이 선택적으로 절단하는 결합은 단일가닥 부분에 있는 피리미딘-푸린 결합들이 대부분이지만 피리미딘-피리미딘 결합들도 일부 절단한다. 그러므로 안지오제닌은 피리미딘 염기들의 3'쪽으로 있는 포스포디에스테르 결합을 특이하게 절단하는 효소 활성을 가지고 있다. 그러나 푸린 염기들의 3'쪽으로 있는 포스포디에스테르 결합이 절단되는 경우는 하나도 없다. 최근에 Rybak와 Vallee³도 이와 비슷한 관찰을 하였다.

pH 3.5인 용액에서 안지오제닌에 민감한 결합들. Mg²⁺이 없고 pH 3.5인 조건에서 안지오제닌이 5S rRNA를 절단하는 자리들을 Fig. 2의 방사선자동사전에서 볼 수 있다. 이 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 모두 14개의 결합이 절단되는데 그 중 강하게 절단되는 결합은 C₁₇-G₁₈, U₅₅-G₅₆, U₇₄-G₇₅, U₇₇-A₇₈, U₁₀₃-A₁₀₄들이다. A 줄기의 C₁₁₄-A₁₁₅ 결합과 E 줄기의 U₈₀-G₈₁, C₉₃-A₉₄ 결합들도 약하게 절단되는 것을 볼 수 있는데 이것은 강한 산성 용액에서는 5S rRNA의 줄기들의 이차구조가 다소 느슨하게 해체되기 때문일 것으로 생각된다.

D-d 구역과 B-b 구역의 구조. Fig. 3에서 U₇₄-G₇₅, U₇₇-A₇₈, U₁₀₃-A₁₀₄ 결합들은 Mg²⁺이 있든 없든 안지오제닌으로 절단되는 것을 볼 수 있다. 이러한

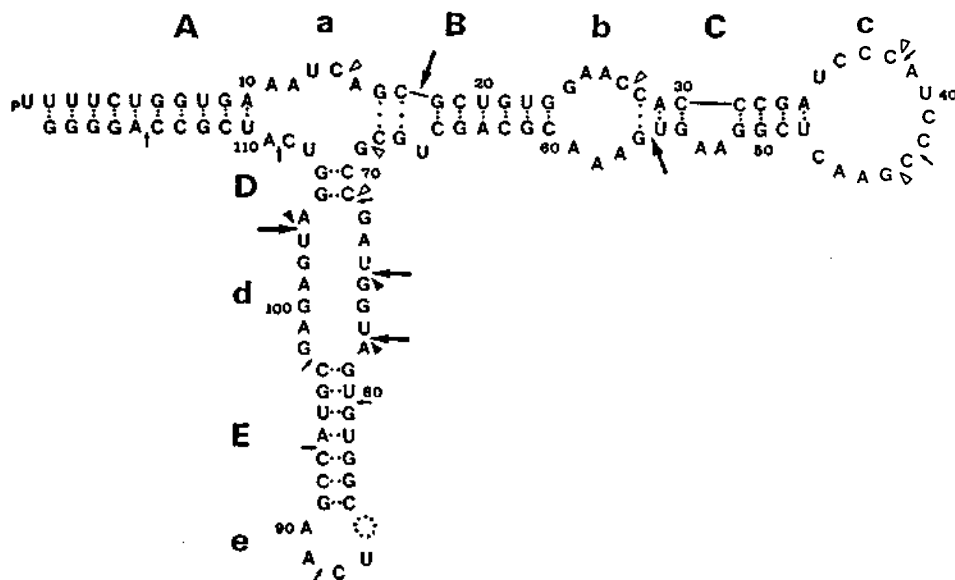


Fig. 3. Secondary structure of *X. celebensis* 5S rRNA constructed according to the data shown on Fig. 1 and 2. \triangleright indicates cleavage sites that are cleaved in the absence of Mg^{2+} but not in the presence of Mg^{2+} . \blacktriangleright indicates cleavage sites that are cleaved independently of Mg^{2+} . Arrows indicate the cleavage sites in the absence of Mg^{2+} at pH 3.5 (\Rightarrow , strong; \rightarrow , weak). Dotted circle at position 86 means the nucleotide deletion. It was added for the convenience of numbering of the sequence.

사실들은 자연상태의 5S rRNA 구조에서 돌쩌귀 역할을 할 것으로 추정되는 d 고리 부분의 $U_{74}-G_{75}$, $U_{77}-A_{78}$, $U_{103}-A_{104}$ 결합들이 분자의 접힘으로 불안정하게 되어서 안지오제닌에 의해 민감하게 작용을 받게 되는 것으로 생각된다. 최근에 우리는 Fe(II)-EDTA를 가지고 분석한 결과에서 d 고리 부분이 10 mM의 Mg^{2+} 이 있는 용액에서 삼차상호작용에 관여한다는 것을 관찰하였다¹. 이와 같은 사실들을 종합해 보면 5S rRNA의 d 고리 부분에서는 Mg^{2+} 이온과 수소 이온의 농도에 따라 매우 민감한 구조 변화가 일어난다는 것을 짐작할 수 있다. d 고리에 $G_{72} * A_{104}$, $G_{75} * A_{101}$, $G_{76} * G_{100}$, $A_{78} * G_{98}$ 등의 비표준형 염기쌍들이 형성될 수 있다는 것은 Traub와 Sussmann⁹이 처음으로 제안하였다. 그러나 d 고리가 이러한 비표준형 염기쌍들을 함유하는 이중나선을 이룰 수 있을지 없을지에 대해서는 서로 다른 의견들이 보고되어 있어서 아직 논쟁의 여지가 있다⁹⁻¹¹. 본 연구 결과로 미루어 보아 d 고리에서 그러한 비표준형 염기쌍들이 형성된다 하더라도 그것들의 결합력은 매우 약할 것으로 짐작된다. 이와는 대조

적으로, $C_{70} : G_{106}$ 염기쌍과 $C_{71} : G_{105}$ 염기쌍은 모든 조건에서 매우 안정한 D 줄기의 구조를 이루는데 기여하고 있음이 확인되어 있다⁸. 그러므로 5S rRNA가 삼차구조로 접힐 때 돌쩌귀의 역할을 하는 것은 D 줄기와 d 고리가 합친 광범위한 부분이 아니라 d 고리만으로 가능할 것임을 알 수 있다. 이와 관련해서 우리가 원핵세포의 5S rRNA에 대해서 제안한 이차구조 일반모형에서 d 고리 부분을 확장된 염기쌍들로 제안한 것은 타당한 것이었다고 생각한다⁸.

한편, B 줄기와 C 줄기에는 피리미딘-푸린 또는 피리미딘-피리미딘 결합들이 많이 있음에도 불구하고, 표준형 염기쌍들로 구성되어 줄기에 있는 피리미딘-푸린 결합이 안지오제닌에 의해서 하나도 절단되지 않았다. 이것은 B-b 구역에서 돌쩌귀의 역할을 하는 주요한 부분은 b 고리임을 암시하는 것으로 생각된다(Fig. 3 참조). 그러나, b 고리와 C 줄기의 접속부분에 있는 $A_{28}-C_{30}$ 와 $G_{54}-U_{55}$ 의 결합들이 리보핵산 가수분해효소 S_1 과 T_1 에 의해서 각각 약하게나마 공격을 받는다는 이미 보고된 우리의 관

찰로 보이', 5S rRNA가 삼차구조로 접힐 때 이 접속부분의 이차구조가 일부 분해되는 것이 아닌가 생각된다. 이 문제는 앞으로 더 세밀히 조사하여야 할 문제라고 생각한다.

저자들 중 임자혜는 1993년 경기대학교 학술연구비의 지원을 받았기에 이에 감사하는 바이다.

인 용 문 헌

1. 조봉래; 이영훈; 최명언; 박인원. 대한화학회지 1993, 37, 237.
2. 조봉래; 장수익; 박인원. 대한화학회 제 70회 연회 초록집, 1992; p 252.
3. Rybak, S. M.; Vallee, B. L. *Biochemistry* 1988, 27, 2288.
4. Bond, M. D.; Vallee, B. L. *Biochemistry* 1988, 27, 6268.
5. Sogin, M. L.; Pace, B.; Pace, N. R. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 1350.
6. Koh, M. J.; Park, I. W.; Lee, S. Y. *Korean Biochem. J.* 1986, 19, 61.
7. 조봉래; 고문주; 임자혜; 박인원. 한국생화학회지 1991, 24, 55.
8. 조봉래; 최명언; 서세원; 임자혜; 고문주; 박인원. 대한화학회지 1992, 36, 460.
9. Traub, W.; Sussman, J. *Nucleic Acid Res.* 1982, 10, 2701.
10. Studica, G. M.; Eiserling, F. A.; Lake, J. A. *Nucleic Acid Res.* 1981, 9, 1885.
11. Wolters, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acid Res.* 1988, 16, r1.