

NiCR, CuCR 및 CdCR에 의한 tRNA^{Phe}의 화학적 절단

金姬廷 · 高文珠

조선대학교 자연과학대학 화학과
(1997. 7. 26 접수)

Chemical Cleavage of tRNA^{Phe} by NiCR, CuCR and CdCR

Hee-Joung Kim and Moonjoo Koh

Department of Chemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea
(Received July 26, 1997)

많은 RNA 분자들은 생물학적 활성을 위하여 특이한 삼차구조를 필요로 한다. 최근에는 NMR이 구조에 대한 유용한 정보를 많이 제공해 주고 있으나 그 대상이 비교적 작은 분자로 제한되고 있다.¹ 광범위한 RNA 구조의 서로 다른 구조적 특징들을 밝히는 데는 서로 다른 종류의 여러 가지 '화학적 핵산 가수분해효소(chemical nuclease)'가 이용된다.² 화학적 핵산가수분해효소는 DNA나 RNA의 당 부분을 산화시켜서 분해시키는 산화-환원 활성이 큰 배위착물로서, 보통 의도한 목표에 접근하기 쉬운 정도로 작고, 상당한 형태에 대한 특이성을 가질 만큼 크기가 큰 것이 유용하다. 이러한 화학시약의 특이성은 그 구조가 비교적 잘 알려진 효모의 tRNA^{Phe}나 tRNA^{Asp}에 적용시키는 연구를 통해서 이루어지고 있다.

여러 가지 전이금속 착물들이 DNA나 RNA의 구조를 결정하는데 효과적으로 이용되었다. N-메틸피리디늄기를 함유하는 금속포르피린들은 KHSO₅와 같은 산소 원자 주개에 의하여 활성화되면 효과적인 DNA 절단제로서도 작용한다.³ 최근에 올리고뉴클레오타이드 중 G잔기에만 매우 특이성을 가지는 금속을 함유하는 시약들이 개발되었다. Chen 등은 니켈착물, NiCR[(2,12-dimethyl-3,7,11,17-tetraazabicyclo[11.3.1]heptadeca-1(17), 2,22,13,15-pentaenato) nickel(II) perchlorate]이 KHSO₅ 존재 하에 짝을 이루지 않거나, 고리를 이루는 G잔기들을 특이하게 산화시킨다는 것을 보여 주었다.⁴ 본 연구에서는 NiCR, CuCR 및 CdCR의 금속이온 착물을 합성하고 이것을 구조가 비교적 잘 알려진 tRNA^{Phe}에 반응시켜서 그것이

구조에 특이하게 절단을 일으키는 것을 조사하였다. 이 결과 금속이온착물이나 산화제에 상관없이 표준적인 아닐린 반응에 의한 자발적 절단을 관찰을 관찰하였으며 이미 알려진 니켈 착물 대신에 구리와 카드뮴을 중심 원자로 사용한 경우에도 니켈 착물과 유사한 절단이 관찰되었다.

산화제인 모노과산화프탈산 마그네슘(MMPP)과 KHSO₅(2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄, oxone)은 Aldrich(미국)로부터 구입하였다. 리보핵산 가수분해효소 T1과 RNA 연결효소는 Pharmacia(스웨덴)로부터 구입하였다. 다른 시약은 모두 Sigma(미국)에서 구입하였다. [5'-³²P]pCp (3000 Ci/mmol)은 Amersham(영국)으로부터 구입하였다.

NiCR은 발표된 방법⁵ 따라서 합성하였다. CuCR과 CdCR은 NiCR과 같은 방법으로 합성하였으며 NiCl₂ 대신에 각각 CuCl₂와 CdCl₂를 사용하였다.

효모 tRNA^{Phe}는 Sigma로부터 구입하여 정제하여⁶ 사용하였다. 구입한 RNA를 완충 용액(0.3 M NaOAc, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)에 녹인 후 패놀-클로로포름 용액으로 추출하여 에탄올 침전시켰다. 침전물을 다시 완충용액에 녹인 후, 분취하여 에탄올 침전시켜 보관하였다. 효모 tRNA^{Phe}의 3'-말단 표지는 RNA 연결효소와 [5'-³²P]pCp를 사용하였다. 표지된 RNA는 10% 폴리아크릴아미드겔에서 전기이동시킨 후, 방사선자동사진법으로 위치를 찾아내어서 겔에서 오려내어 완충용액(45 mM Tris, 45 mM 붕산, 1.25 mM EDTA, pH 8.0)에서 추출하였다. 이 혼합물을 37°C에서 4시간 정도 흔들어 준 후, 원

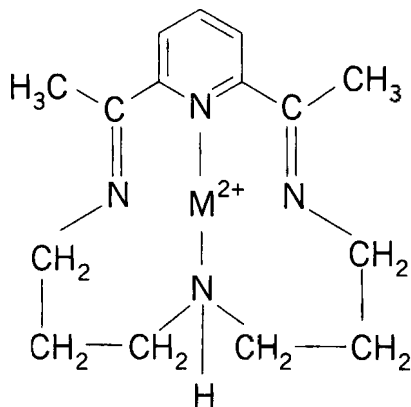


Fig. 1. Metal complex, M-CR. M denotes Ni, Cu and Cd.

십분리하고 상층액을 에탄올 침전시켰다. 이 RNA 분획들을 재원형화하거나 변형시켜 구조를 확인하는 실험을 수행하였다. 재원형화는 최종부피 30 μ l(10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM 인산 칼륨, pH 7.0, 운반체 tRNA 3 μ g 함유)에서 50°C에서 10분간 가열한 후 서서히 실온까지 냉각시켜서 이루어졌다. 변형성 조건은 위의 완충용액에서 MgCl₂를 제외한 용액에서 같은 조건으로 가열한 후 얼음물에 급하게 냉각시켰다.

금속착물에 의해 변형된 염기를 산화하는 역할을 가질 것으로 추정되는 산화제가 금속착물이 존재하지 않는 경우에도 RNA의 절단에 영향을 미치는지에 대한 확인 실험을 수행하였다. 반응 조건은 산화제의 농도는 30 μ M-30 mM MMPP 또는 2 μ M-2 mM KHSO₅ 범위에서, 반응 온도는 18°C에서 33°C 까지 범위에서, 반응 시간은 10분에서 20분까지 변화시켜가며 반응을 수행하였다.

세 가지 금속착물 용액의 농도는 30 μ M과 3 μ M으로 조제하였다. 금속착물용액 1 μ l, 산화제(3 mM MMPP 또는 200 μ M KHSO₅) 1 μ l를 RNA 시료 20 μ l에 가한 후 18°C에서 18분 또는 30분간 반응을 수행하였다. 반응이 완결된 용액은 페놀-클로로포름으로 추출한 후 에탄올 침전시켰다.

위의 각 반응이 완결된 반응 혼합물을 페놀-클로로포름 용액으로 추출한 다음, 에탄올로 침전시켰다. 에탄올 침전된 RNA를 건조시켜 아세트산-아닐린 완충용액(1 M 아닐린-아세트산, pH 4.5)을 20 μ l 가한 후, 60°C에서 20분간 반응시킨 후, 건조시켰다.⁷

또한, 아세트산 아닐린 완충용액으로 변형된 염기

를 절단하는 단계에 있어서 절단되는 염기가 생기는지를 확인하기 위하여 변형시키지 않은 RNA를 건조시켜 반응을 수행하였다.

tRNA의 절단된 위치들은 20% 폴리아크릴아미드 겔(7 M 우레아)에서 전기이동 시킨 후 자동방사선 사진법으로 확인하였다.⁶

3'-말단을 표지하여 Mg²⁺ 이온 존재 하에서 재원형화한 tRNA나 변형시킨 tRNA에서는 그 처리 과정에서 자발적인 분해가 일어나지 않았다. 이렇게 재원형화한 tRNA나 변형시킨 tRNA에 금속 착물과 산화제나 산화제만 처리한 다음 아세트산 아닐린 처리를 하지 않는 경우에도 자발적 분해는 일어나지 않았다. 그러나 재원형화한 tRNA나 변형시킨 tRNA를 아세트산 아닐린으로 처리한 경우에는 강력한 분해가 Y37과 m⁷G46에서 관찰되었다. 이 위치가 변형이나 재원형화 도중에 자발적으로 절단되지 않았다는 것은 아닐린을 처리하지 않은 RNA를 같이 전기이동시켜서 확인할 수 있었다(Fig. 2). 아닐린에 의한 이와 같은 자발적 절단은 보고되지 않았으며 다만 N-2 메틸 G10의 경우에 KHSO₅가 존재할 때 금속 착물에 무관하게 절단된다고 보고되었다.⁴ 그러나 우리의 결과는 재원형화한 경우나 변형시킨 경우 모두에서 산화제나 금속 착물이 존재하지 않았을 때 표준적인 아닐린 반응만으로도 절단이 일어남을 밝혀서 이들의 결과와는 일치하지는 않는다. m⁷G46의 경우 N-7 위치에 메틸화가 되어 있으므로 환원-아닐린 반응의 기질이 될 수 있다는 것은 분명해 보인다.⁷ 이것을 이용하여 tRNA^{Phe}의 m⁷G46에서 특이한 절단을 일으킬 수 있다.⁸ 소수염기인 Y(wybutosine)은 화학적 염기서열 결정실험에서 구아닌과 같은 반응 양식을 나타내고 있다.⁹ 특히 이러한 절단은 산화제를 첨가한 경우에는 더욱 절단 효과가 증진되었다.

산화제는 MMPP나 KHSO₅를 사용하였다. 산화제를 사용함에 있어서 KHSO₅가 더 많은 염기를 절단하는 반면, MMPP가 절단된 염기에 대한 선택성이 더 크게 나타났다(Fig. 3). 이것은 KHSO₅가 더 강력한 산화제이기 때문에 산화제의 능력과 비례하는 것으로 생각된다.

본 연구의 결과, 반응 온도가 20°C이고 반응시간이 18분일 때 선택적인 절단을 일으키는 데 있어서 RNA의 양이 2.6 μ g일 때, MMPP는 300 μ M-30 μ M 농도 범위에서 가장 좋은 결과를 제시하였고,

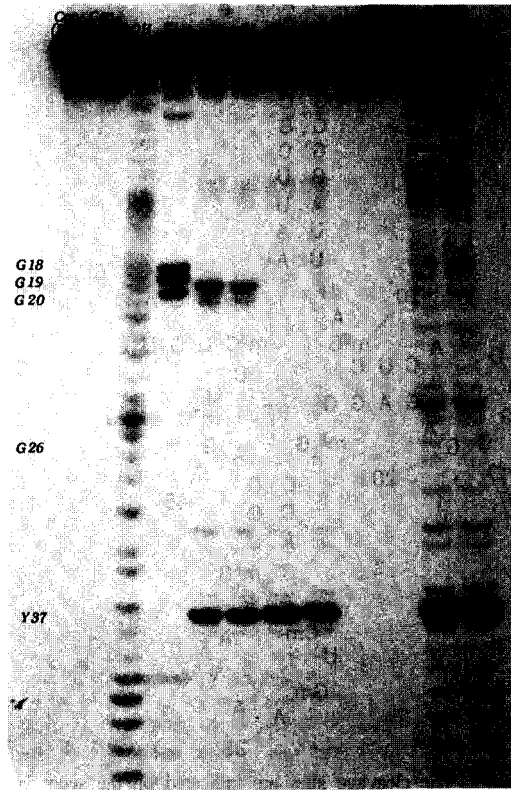


Fig. 2. Specific cleavage of tRNA^{Phe} (yeast). ³¹⁻³²P-labeled tRNA (0.26 μg per lane) was treated as described below and analyzed by gel electrophoresis (20% polyacrylamide, 7 M urea). Renatured tRNA^{Phe} (lane con(ren)) or denatured tRNA^{Phe} (lane con(den)) was subjected to electrophoresis with no treatments. Alkaline hydrolysis (lane OH) and RNase T1 reaction (lane T1) were performed as described (Rickwood, 1982). Renatured tRNA^{Phe} (lane 1) or denatured tRNA^{Phe} (lane 2) was subjected to aniline acetate treatment after incubation (20 min) at 20°C with NiCR (3 μM) and MMPP (300 μM). Renatured tRNA^{Phe} (lane 3) or denatured tRNA^{Phe} (lane 4) was subjected to aniline acetate treatment after incubation (20 min) with only MMPP (300 μM). Renatured tRNA^{Phe} (lane 5) or denatured tRNA^{Phe} (lane 6) was subjected to electrophoresis without aniline acetate treatment after incubation (20 min) with only MMPP (300 μM). Renatured tRNA^{Phe} (lane 7) or denatured tRNA^{Phe} (lane 8) was subjected to aniline acetate treatment with no additional reagents.

KHSO₅는 20 μM-2 μM 농도 범위에서 가장 좋은 결과를 제시하였다.

재원형화된 tRNA를 금속 착물과 산화제로 동시에 처리한 경우 아닐린 반응을 시키면, 새로운 절단 자

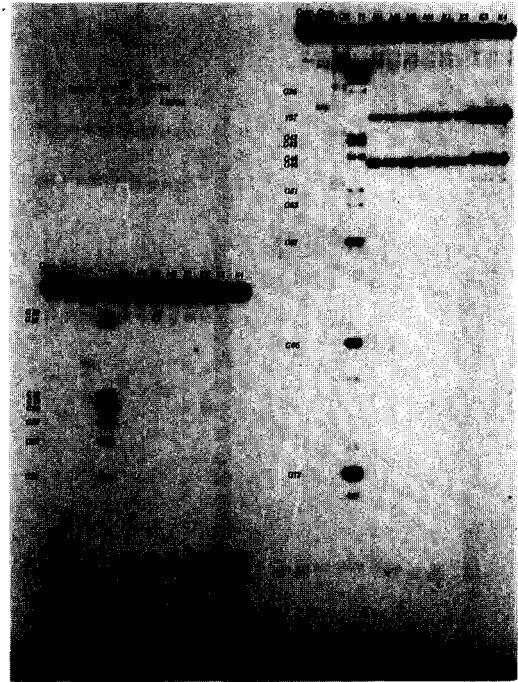


Fig. 3. Specific cleavage of tRNA^{Phe} (yeast) according to the concentration of oxidants. Reaction and analysis conditions were same as those of Fig. 2. Lanes con(ren), con(den), OH and T1 were same as those of Fig. 2. Renatured tRNA^{Phe} (lane M1) or denatured tRNA^{Phe} (lane M2) was subjected to aniline acetate treatment after incubation (20 min) at 20°C with MMPP (300 μM). Renatured tRNA^{Phe} (lane M3) or denatured tRNA^{Phe} (lane M4) was subjected to aniline acetate treatment after incubation (20 min) at 20°C with MMPP (3 mM). Lanes K1, K2, K3 and K4 were same as lanes M1, M2, M3 and M4 respectively except KHSO₅ was used instead of MMPP.

리가 G19에서 강하게, G20에서 약하게 관찰되었다 (Fig. 2, Fig. 4). 이 위치는 Chen 등이⁴ 보고한 재원형화된 상태에서 노출된 잔기 네 개 중의 두 개에 해당하며 그 중에서 G19가 가장 강력하게 절단되었다는 보고와 일치한다.

Fe-EDTA를 이용한 tRNA^{Phe}의 절단 결과에서도 Y37과 G46은 보호되지 않지만 G19는 보호를 받고 있어서 우리의 결과와 일치한다.⁹

각 NiCR 이외의 CuCR과 CdCR의 경우에는 금속 착물과 산화제를 사용하여 tRNA를 변형 한 후 절단 반응을 시켰을 때에도 G19, G20 위치에서의 추가적인 절단을 관찰할 수 있었다. Rokita 등은¹⁰ CuCR의

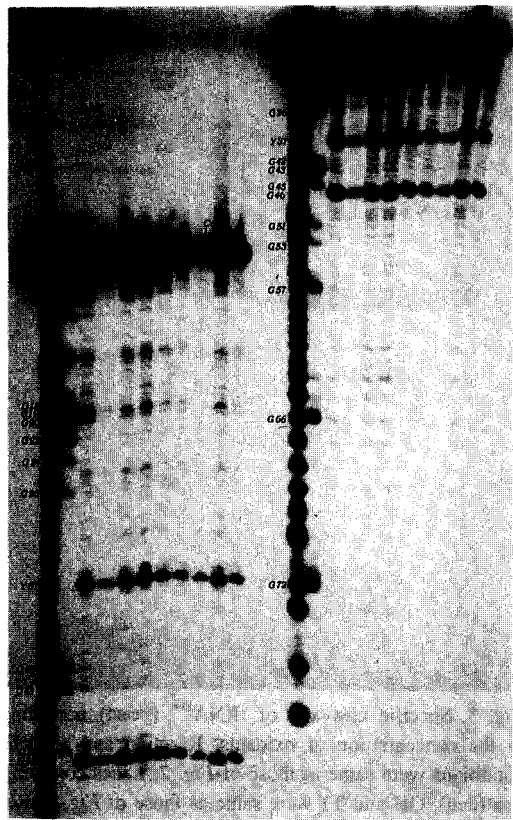


Fig. 4. Specific cleavage of tRNA^{Phe} (yeast) by metal complexes. 3-³²P-labeled tRNA (0.26 μg per lane) was treated as described below and analyzed by gel electrophoresis (20% polyacrylamide, 7 M urea). Lanes OH and T1 were same as those of Fig. 2. Renatured tRNA^{Phe} was subjected to aniline acetate treatment after incubation (30 min) with 3 M of NiCR, CuCR and CdCR (lane Ni1, Cu1 and Cd1 respectively). Lanes Ni2, Cu2 and Cd2 were same as lanes Ni1, Cu1 and Cd1 respectively except 0.3 μM of metal complexes were used. Lanes lane Ni3, Cu3 and Cd3 were same as lanes Ni1, Cu1 and Cd1 respectively except denatured tRNA^{Phe} was used.

경우에 니켈과 같은 결과를 얻을 수 없었다. CdCR의 경우 이 실험에서 최초로 시도되었으며 정도는 약하지만 역시 NiCR과 같은 구조 특이성 변형 반응을 일으켰다. 이것은 니켈 화합물만이 노출된 구아닌 염기를 변형시킬 수 있다는 주장과는¹⁰ 일치하지 않는다.

아닐린에 의해서 일어나는 절단이 일어나는 Y37과 G46 염기는 tRNA^{Phe}의 이차 구조에서 짝을 이루지 않고 단일가닥으로 존재하는 염기들이다(Fig.

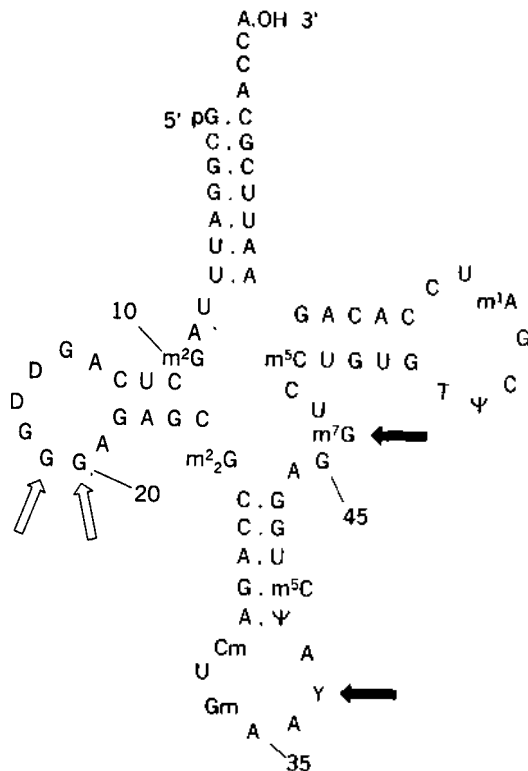


Fig. 5. The cleavage sites are indicated on the secondary structure of tRNA^{Phe}. Solid arrows indicate the sites of spontaneous cleavage by standard aniline reaction. Open arrows indicate the sites cleaved by metal complexes.

5). 또한 tRNA^{Phe}의 삼차 접힘 구조에서, Y37 염기는 역코돈 고리의 단일가닥으로 존재하고, m⁷G46 염기는 'L' 자형의 모퉁이 부근에 존재하면서 G22 염기와 수소결합을 이루고 또, G22 염기는 C14 염기와 수소결합을 이루어서 세 개의 염기가 수소결합을 형성하고 있다.¹¹

금속 착물과 산화제에 의해서 절단되는 G19, G20 염기는 tRNA^{Phe}의 이차구조에서 D-고리에 위치한 염기로서 삼차구조에서는 'L' 자형의 구부러진 모퉁이에 바깥쪽에 존재하며, G20은 짝을 이루지 않고 있으나 G19는 C56과 짝을 이루고 있다.

본 연구 결과 금속 착물을 RNA구조를 밝히는 화학적 탐침으로 사용하기 위해서는 아닐린 절단 반응에 의한 자발적 절단을 반드시 먼저 관찰하여야 하며 그러한 자발적 절단이 산화제에 의하여 더욱 증진된다는 것을 밝혔다. 또 선택적 절단을 위한 화학 시약으로서 기존에 밝혀진 니켈화합물, NiCR 이외

에 구리나 카드뮴의 착물은 정도가 약하기는 하지만 같은 종류의 변형 반응을 일으킨다는 결과를 얻었다.

이 논문은 1994년도 조선대학교 교내학술연구비의 지원으로 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. Jaeger, J. A.; SantaLucia, Jr. J.; Tinoco, Jr. I. *Ann. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 255.
2. Ehresmann, C.; Baudin, F.; Mougel, M.; Romby, P.; Ebel, J. -P.; Ehresmann, B. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 22, 9109.
3. Bernadou, J.; Pratviel, G.; Girardet, B. M.; Meunier, B. *Biochemistry* **1989**, 28, 7268.
4. Chen, X.; Woodson, S. A.; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Biochemistry* **1993**, 32, 7610.
5. Karn, J. L.; Busch, D. H. *Nature*, **1966**, 211, 160.
6. Rickwood, D.; Hames, B. D. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids-A Practical Approach*; IRL Press: Oxford, U. K., 1982.
7. Peattie, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 1760.
8. Zueva, V. S.; Mankin, A. S.; Bogdanov, A. A.; Baratova, A. A. *Eur. J. Biochem.* **1985**, 146, 679-687.
9. Latham, J. A. and Cech, T. R. *Science* **1989**, 245, 276.
10. Rokita, S.; Zheng, P.; Tang, N.; Cheng C. -C.; Yeh, R. -H.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. In *Genetic response to metals*; Sakar, B. Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, U.S.A., 1994; p 201.
11. Kim, S. H.; Suddath, F. L.; Quingley, G. J.; McPherson, A.; Sussman, J. L.; Wang, A. H. J.; Seeman N. C.; Rich, A. *Science* **1974**, 185, 435.