

단 신

대장균의 선구-M1 RNA의 3'-말단부분을 절단하는 리보핵산 가수분해효소 활성을 나타내는 Dps 단백질

高在亨 · 金光善 · 沈素暎[†] · 趙峯來^{††} · 李永勳^{†*} · 朴仁源

서울대학교 화학과

[†]한국과학기술원 화학과

^{††}청주대학교 화학과

(1999. 11. 8 접수)

The Dps Protein Shows an Ribonuclease Activity Cleaving the 3' Terminal Region of the Precursor M1 RNA of *Escherichia coli*

Jae-hyeong Ko, Kwang-sun Kim, Soyeong Sim[†], Bongrae Cho^{††},
Younghoon Lee^{†*}, and Inwon Park

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

[†]Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
Taejon 305-701, Korea

^{††}Department of Chemistry, Chongju University, Chongju 360-764, Korea

(Received November 8, 1999)

서 론

RNase P의 RNA 성분인 M1 RNA는 선구-M1 RNA의 가공으로 형성된다는 것이 알려져 있다.¹ M1 RNA의 선구체의 3' 말단에 있는 36개의 여분의 뉴클레오타이드가 가공과정에서 절제됨으로써 성숙한 M1 RNA가 형성된다.

지금까지 많은 연구진이 선구-M1 RNA의 가공과정을 연구하였지만, 아직까지 가공에 관여하는 효소들은 밝혀져 있지 않다. 선구-M1 RNA의 가공자리 근처에 RNase E가 인식하는 염기서열이 있는 것으로 미루어, RNase E가 선구-M1 RNA의 가공효소일 것으로 추측되기도 하였지만, RNase E만으로는 선구-M1 RNA에서 성숙한 M1 RNA를 만들 수 없다는 것이 밝혀져 있다.¹ 그렇지만, 최근의 연구결과들은 RNase E가 어떤 방식으로든 선구-M1 RNA의 가공에 관여할 것임을 보여주고 있다.^{2,3} Altman의 연구진²은 *E. coli*에서 RNase E가 과량으로 발현되도록 한 다음 40% 황산 암모늄으로 침전시켜 얻은 분획이 선구-M1 RNA의

가공에 미치는 영향을 조사한 결과, 단백질 양이 증가할수록 성숙한 M1 RNA가 많이 만들어진다는 것을 관찰하였다. 이 분획은 선구-M1 RNA의 +378번의 G 자리와 +379번의 A 자리를 자른다. 한편, 우리 연구진³은 선구-M1 RNA의 절단부위에 RNase E가 인식하는 연속부분 GAUUU에 돌연변이를 일으킨 다음 생체내에서 이 돌연변이체가 가공되는지를 조사한 결과, 그것은 가공되지 않거나 매우 약하게 가공되는 것을 관찰하였는데, 이 결과는 RNase E가 어떤 방식으로든 선구-M1 RNA의 가공에 관여한다는 것을 뒷받침해주는 증거로 생각한다. 또한, 우리 연구진⁴은 최근에 선구-M1 RNA의 가공효소를 부분 정제하여 그 특성을 조사한 바 있는데, 이 부분 정제한 가공효소는 선구-M1 RNA의 +378번의 G 자리와 +379번의 A 자리뿐 아니라, +383번의 A 자리도 절단한다는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들을 종합해보면 선구-M1 RNA의 가공은, Apirion의 연구진이 제안한 바와 같이,⁵ 한 가지 효소로 일어나는 것이 아니라 여러 효소들의 복합체인 processosome으로 일어나는 것으로 생각된다.

이번 연구에서 우리는 선구-MI RNA의 3' 말단을 가공하는 효소 활성을 가진 단백질을 정제하여 그 성질을 알아보고자 하였다. 이번에 정제한 Dps (DNA protection during starvation) 단백질은 세포에서 DNA와 결합하여 DNA를 보호하는 기능을 가진 것으로 알려져 있기 때문에,⁶⁷ 그것이 선구-MI RNA의 가공에 관여하는 리보핵산 가수분해효소의 활성을 가진다는 것은 매우 특이한 사실이다.

실 험

선구-MI RNA를 가공하는 활성의 분석. 선구-MI RNA의 제조와 ³²P 표지 그리고 선구-MI RNA를 가공하는 활성의 분석은 김하동 등⁶⁷의 방법에 따랐다.

S30 분획의 제조와 열처리. 가공효소의 분리에는 RNase I에 결합이 있는 대장균 1500 균주를 사용하였다. 대장균 세포 15 g을 4°C로 냉각한 막차사발에서 30 g의 알루미늄을 넣고 골고루 간 다음, 파쇄액에 완충용액 A (20 mM Tris, pH 8.0, 40 mM NH₄Cl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT) 100 mL을 넣고 잘 녹였다. 여기에 DNase I (1 unit/ μ L) 30 μ L를 넣고 30분간 다시 저은 다음, Centricon A 8.24 로터로 6000 \times g에서 15분간 원심분리하여 알루미늄을 제거하고 상층액을 Beckman 초원심분리기로 30,000 \times g에서 1 시간 원심분리해서 그 상층액을 모았다 (S30 분획). 열처리하는 Lee 등의 방법⁶⁸에 따랐다. S30 분획을 50 mL 시험관에 나누어 담고 62°C에서 15 분간 열처리를 했다. 얼음물에서 약 15분간 냉각한 후 30 분간 얼음 속에 두었다가 원심분리해서 상층액만을 모았다.

DEAE Sepharose 관 크로마토그래피와 황산 암모늄 분별침전. 약 40 mL 부피의 DEAE-Sepharose 수지를 관에 채우고 완충용액 A로 평형화한 다음, 열처리해서 얻은 상층액 약 30 mL에 완충용액 A를 첨가해서 100 mL로 희석하여 DEAE-Sepharose 관에 싣고 완충용액 A로 충분히 씻었다. 단백질은 완충용액 A에 0 M에서 0.1 M까지의 KCl을 포함하는 완충용액으로 용출하였다. 용출한 단백질 분획들을 모아 최종농도가 20%가 되도록 황산 암모늄을 천천히 넣고 녹인 뒤 약 15분간 저고 14,000 rpm에서 15분간 원심분리해서 침전물을 얻었다. 이렇게 해서 생기는 상층액에서 마찬가지로 점차로 황산 암모늄 농도를 각각 40%, 60%,

80%로 높여서 침전물을 얻었다. 이들 중 60-80% 사이의 황산 암모늄 농도에서 생기는 침전물을 완충용액 B (30 mM HEPES, 30 mM imidazole, pH 7.5) 1.4 mL에 녹였다.

Sephacryl S-200 관 크로마토그래피. 직경 1 cm, 높이 46 cm인 관에 Sephacryl S-200 수지를 채우고 완충용액 B로 평형화한 다음, 황산암모늄 침전물 중 0.7 mL을 관 크로마토그래피로 분리하였다. 분리한 분획들의 선구-MI RNA 가공활성을 조사하였다. 용출한 분획 속에 들어있는 단백질의 종류를 알아보기 위해 분획들을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기이동한 다음 Coomassie blue 염료로 착색하여 단백질 띠들을 확인하고 이를 각 분획들의 선구-MI RNA 가공활성과 비교하였다.

19-kD 단백질의 아미노산 서열 결정. 가공효소로 작용하는 19-kD 단백질의 정체를 밝히기 위해서 아미노산 서열을 결정하였다. 먼저 단백질 분획을 미리 착색한 크기표지물과 함께 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기이동하여 분리하고 겔을 염색하지 않은 채 PVDF 막으로 단백질을 전기이동법으로 옮기고, 이 막을 Coomassie blue 염료로 염색하여 19-kD 위치의 단백질 띠를 올려내어 기초과학연구원 서울분소에 의뢰하여 10개의 아미노산 서열을 결정하였다. 결정한 아미노산 서열을 미국 NCBI Database에서 검색하여 단백질의 정체를 밝혔다.

dps 유전자의 클로닝. dps 유전자는 PCR 방법을 이용하여 클로닝하였다.⁹ BamHI 인식자리를 가지고 있는 5'-CGGGATCCATGAGTACCGCTAAATTA-3'과 HindIII 인식자리를 가지고 있는 3'-CCCAAGCTTATTCGATGTTAGACTC-5'을 사용하여 균주 W3110에서 얻어낸 대장균의 염색체 DNA 1 μ g을 20 회의 PCR로 증폭하여 약 520 개 염기쌍을 가진 생성물을 얻었다. 이 생성물을 1.5% 아가로스 겔 전기이동법으로 분리 정제한 다음, 각각 20 unit의 BamHI과 HindIII로 37°C에서 3시간 항온처리하였다. 미국 Qiagen사에서 구입한 pQE30 플라스미드를 마찬가지로 제한효소로 처리하여 이 생성물과 앞서 얻은 DNA 생성물을 2 unit의 DNA 연결효소로 4°C에서 하룻밤 처리하여 연결하였다. 연결된 플라스미드를 Cohen 등의 방법⁶⁹을 이용하여 대장균의 JM109 균주에 형질전환하였다. 재조합 플라스미드에 연결된 dps 유전자는 DNA 염기서열을 결정함으로써 확인하였다.

플라스미드에 연결된 *dps* 유전자 끝에는 여섯 개의 His 코돈이 연결되어 있으므로 *dps* 유전자의 발현으로 생성되는 재조합 Dps 단백질의 N-말단에는 6개의 His 잔기가 포함되게 된다.

재조합 Dps 단백질의 정제 및 활성 분석. N-말단에 His 잔기들이 부착된 재조합 Dps 단백질을 정제하기 위한 Cu-IDA (copper-imidodiacetate) 컬럼은 Zachariou의 방법¹¹을 변형하여 제조하였다. 재조합 Dps 단백질을 대량으로 얻기 위하여 50 µg/mL 농도의 ampicillin이 함유된 100 mL의 LB 배지에서 형질변환된 JM109 세포를 600 nm에서의 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다. 여기에 최종농도가 0.5 mM이 되도록 IPTG를 넣고 3시간 더 배양하였다. 4,000 rpm의 속도로 원심분리하여 얻은 세포에 완충용액 C (20 mM Tris-Cl, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.5) 10 mL을 넣고 초음파파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄액을 15,000 rpm의 속도로 20 분간 원심분리하여 얻은 상층액을 완충용액 C로 평형화한 Cu-IDA 수지 4 mL이 채워진 관에 싣고 완충용액 C로 충분히 씻어주었다. Cu-IDA 수지에 결합한 Dps 단백질을 용리하기 위해서 완충용액 C에 최종농도가 각각 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM이 되도록 imidazole의 농도를 맞춘 용액을 차례로 사용하였다. 각 imidazole 농도의 용액으로 용리한 분획을 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기이동하였다. 최종 정제된 재조합 Dps 단백질을 얻기 위해서 Cu-IDA에서 얻은 활성 분획을 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기이동한 다음, 겔을 염색하지 않고 원하는 재조합 Dps 단백질과 Dps 단백질 조각을 오려내어 완충용액 A를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 두어 용출하였다. 용출된 용액을 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기이동하여 단백질 띠를 확인하였고, 선구-M1 RNA 가공 활성을 분석하였다.

결과 및 고찰

선구-M1 RNA 가공활성을 가진 단백질을 분리하기 위하여 S30 분획의 제조, 열처리, DEAE Sepharose 관 크로마토그래피, 황산암모늄 분별침전, Sephacryl S-200 관 크로마토그래피를 차례로 수행하였다. Sephacryl S-200 관 크로마토그래피로 분리한 단백질 분획에서 선구-M1 RNA 가공 활성이 두드러지게 나

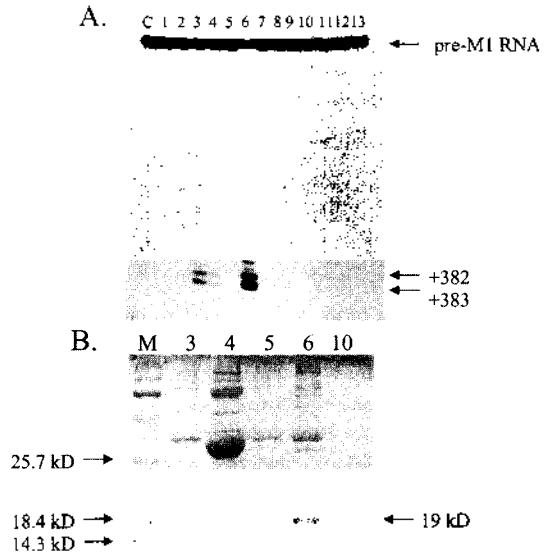


Fig. 1. Nuclease activity assay and SDS-electrophoresis of fractions from Sephacryl S-200. A. The 60~80% ammonium sulfate precipitate (as described in the Experimental section) was subjected to Sephacryl S-200 chromatography. The nuclease activity of the fractions obtained from the chromatography was assayed. Fraction 6 had the highest activity. The substrate for the assay was the pre-M1 RNA radiolabeled at the 3' end with [5'-³²P]pCp. B. Fractions 3, 4, 5, 6, and 10 were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Lane M is protein size markers. The position of 19-kD protein is indicated with an arrow.

타나는 단백질 분획에 약 19-kD 크기의 단백질이 특이하게 존재하는 것을 알았다 (Fig. 1). 이 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과, 그것은 Dps 단백질로 판명되었다 (Fig. 2). Dps 단백질은 1992년 Kotler의 연구진에 의해 처음으로 보고되었고, 그 후 여러 연구들로 이 단백질이 DNA에 비특이적으로 결합하여 과

1 **MSTARLVKSK** ATNLLYLRND VSDSEKKATV ELLNRQVIQF
 41 IDLSLITKQA HWNMRGANFI AVHEMLDGFR TALIDHLDTM
 81 AERAVQLGGV ALGTTQVINS KTKPLKSYPLD IHNVDHLKE
 121 LADRYAIVAN DVRKAIGEAK DDDTADILTA ASRDLKFLW
 161 FIESNIE

Fig. 2. Identification of the 19-kD protein as the Dps protein. The sequence shown in bold letters is the one determined experimentally with the 19-kD protein. The whole amino acid sequence of the Dps protein was identified by searching the Database of NCBI.

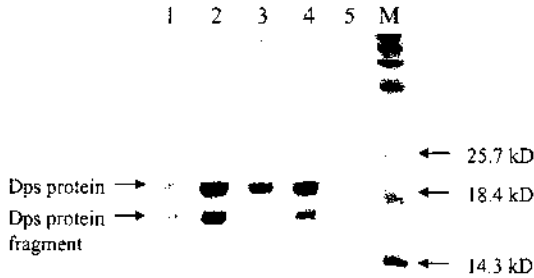


Fig. 3. Purification of the recombinant Dps protein through Cu-IDA column chromatography. Fractions of Cu-IDA column chromatography were separated on 12.5% SDS-polyacrylamide gel. Fractions in lanes 1, 2, 3, 4, 5 were eluted with buffer C (see the Experimental section) containing 10, 50, 100, 200, and 500 mM imidazole, respectively. The Dps protein fragment was generated from the Dps protein possibly with degradation of some amino acid residues at the C-terminus.

산화 수소와 같은 산화제의 공격으로부터 DNA와 세포를 보호한다는 것이 알려졌다.^{6,7} Dps 단백질을 손쉽게 정제하기 위하여 N-말단에 6개의 His 아미노산이 결합되도록 *dps* 유전자를 클로닝하고, 재조합 Dps 단백질을 Cu-IDA 관 크로마토그래피로 정제하였다 (Fig. 3). 이때 Dps 단백질이외에 전기이동 겔상에서 빨리 이동하는 단백질 조각을 관찰하였는데 이는 단백질 정제 과정에서 C-말단의 아미노산 잔기들이 분해된 Dps 단백질 조각으로 생각된다. 순수하게 정제한 재조합 Dps 단백질과 Dps 단백질 조각은 그림 4에서 볼 수 있는 바와 같이 선구-MI RNA를 절단하는 활성을 가지고 있었다. Dps 단백질이 선구-MI RNA를 절단하는 위치는 +382번의 U 자리이었다. Dps 단백질이 지금까지 알려진 기능과는 전혀 다른 리보핵산 가수분해효소의 활성을 가지고 있다는 것은, 그것의 리보핵산 가수분해 활성이 굼주림이나 산화제의 공격과 같은 스트레스로부터 세포를 보호하는 것과 관련이 있거나, 또는 Dps 단백질이 세포내에서 다른 역할도 맡고 있음을 암시한다.

Apirion의 연구진과 우리 연구진은 선구-MI RNA의 가공이 한 효소의 작용으로 일어나는 것이 아니라 복합체를 이루고 있는 여러 효소들의 협동작용으로 일어날 것이라고 제안하였다.^{4,5} Dps 단백질은 이러한 processosome을 이루는 한 단백질일 가능성이 있다. 최근에 우리는 Dps 단백질 이외에도 열충격 단백질인



Fig. 4. Nuclease activity of the Dps protein. The pre-MI RNA radiolabeled with $[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCp}$ was used for the assay of nuclease activity. Lanes 1, 2, and 3 are the control, with the Dps protein, and with the Dps protein fragment, respectively. The cleavage site is indicated with an arrow.

roEL과 DppA가 선구-MI RNA의 가공에 관여하는 효소들임을 발견하였다(김광선 등, 미발표 결과). 위의 두 단백질은 +382 번의 U 자리뿐 아니라 +377 번의 U 자리에서도 선구-MI RNA를 절단한다. 이러한 절단 양식으로 보아, 선구-MI RNA의 가공은 processosome으로 +382 번이 먼저 절단된 다음에 +377 번에서 절단되는 경로를 거쳐 완성될 수도 있을 것으로 추측된다. 그렇지만, 아직 processosome을 이루는 구성 단백질들이 무엇이고, 그것들이 선구-MI RNA의 가공에 관여하는 자세한 기구에 관해서는 밝혀진 것이 없다. 이것은 앞으로 더 연구해야 할 문제이다.

본 연구는 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비로 연구되었으므로 이에 감사한다.

인 용 문 헌

- Gurevitz, M.; Jain, S. K.; Apirion, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 4450.
- Lundberg, U.; Altman, S. *RNA* **1995**, *1*, 327.
- Kim, S.; Kim, H.; Park, I.; Lee, Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19330.
- Kim, H.; Ko, J.; Cho, B.; Lee, Y.; Park, I. *J. Korean*

- Chem. Soc.* **1999**, *43*, 307.
5. Miczak, A.; Srivastava, R. A. K.; Apirion, D. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 1801.
6. Almir n. M.; Link, A. J.; Furlong, D.; Kolter, R. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 2646.
7. Martinez, A.; Kolter, R. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5188.
8. Lee, Y. C.; Lee, B. J.; Hwang, D. S.; Kang, H. S. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 289.
9. Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A.; Collins, F. S. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 154.
10. Cohen, S. N.; Chang, A. C. Y.; Boyer, H. W.; Helling, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3240.
11. Zachariou, M.; Hearn, M. T. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 202.
-