

## 단 신

# M1 RNA 내부 염기서열의 결실이 상위 *rnpB* 전사체의 안정성에 미치는 영향

홍순강\*

초당대학교 소방행정학과

(2008. 9. 5 접수)

## Effects of M1 RNA Internal Deletions on Stability of Upstream *rnpB* Transcripts

Soon Kang Hong\*

Department of Fire Service Administration, Chodang University, Chonnam 534-701, Korea

(Received September 5, 2008)

주제어: M1 RNA, RNA 안정성, RNase E, 대장균

Keywords: M1 RNA, RNA Stability, RNase E, *Escherichia coli*

M1 RNA는 대장균에서 tRNA의 5' 가공과정에 참여하는 RNase P의 촉매 성분이다.<sup>1</sup> 이 RNA는 *rnpB* 유전자의 P-1 촉진유전자 (promoter)에서 전사된 선구 M1 RNA (precursor M1 RNA: pM1 RNA)가 3' 말단에서 가공됨으로써 형성된다.<sup>2,3</sup> 이 가공과정은 내부리보핵산가수분해효소인 RNase E에 의하여 절단됨으로써 시작되며 외부리보핵산가수분해효소들에 의하여 완성된다.<sup>4,5</sup> 그러므로 RNase E는 M1 RNA 생합성에서 핵심요소로 작용한다. *rnpB* 전사는 P-1 촉진유전자 이외에도 상위의 촉진유전자에서부터 일어날 수 있다.<sup>4,7</sup> 그러나 상위촉진유전자에서부터 전사된 상위 전사체는 완전한 M1 RNA의 염기서열을 가지고 있음에도 불구하고 세포내 M1 RNA 생합성에는 기여를 하지 못한다.<sup>7</sup> 그러므로 M1 RNA 생합성은 P-1 촉진유전자에서 전사될 때만 일어난다고 할 수 있다. 세포내에서 상위 촉진유전자에서 발현되는 전사체에서 M1 RNA가 형성되지 않는 이유는 M1 RNA의 합성 조절이 엄격하게 조절되기 때문으로 보인다. M1 RNA가 RNase P의 촉매 성분이기 때문에 세포내에서 필요 이상 많이 만들어 진다면 세포내 RNA 대사에 나쁜 영향을 미칠 수 있다. 상위촉진유전자에서 전사된 전사물은 RNase E에 의하여 절단되어 빨리 분해된다는 것이 알려져 있다.<sup>4,7</sup> 그러므로 상위전사물 (upstream transcripts)의 RNase E-의존적 분

해를 위해서는 완전한 M1 RNA 염기서열의 존재가 필수적일 수 있다. 즉 M1 RNA 염기서열만 가지고 있으면 촉매역할을 할 수 있기 때문에 M1 RNA의 염기서열을 인식하고 절단하는 것이 우선적으로 일어나야 된다는 것이다. 본 연구에서는 상위전사물의 RNase E-의존적 분해를 위하여 완전한 M1 RNA 염기서열이 필요한지를 조사하였다. 이를 위하여 M1 RNA의 내부 염기서열이 결실된 *rnpB* 전사에서 P-1 전사물과 상위전사물의 RNase E-의존성을 비교하려 하였다. M1 RNA의 내부 염기서열이 결실된 *rnpB* 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pLMd5-5와 pLMd5-9는 P-1 촉진유전자에서 전사가 되어 각각 208 nt와 203 nt의 전사물을 만들어 진다(Fig. 1A).<sup>8</sup> 그러나 플라스미드에 존재하는 촉진유전자에서의 전사가 콜로닝된 *rnpB* 유전자 까지 계속해서 전사될 가능성이 있지만 이러한 전사물이 관찰되지 않았다.<sup>8</sup> 상위 전사물이 존재하더라도 불안정하여 빨리 분해되어 관찰되지 않았을 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여 RNase E 결핍균주에서 두 플라스미드에서 상위 전사물이 관찰되는지를 조사하였다(Fig. 1B). RNase E 온도감수성 돌연변이 균주에서 비허용온도인 44 °C에서 P-1 전사물보다 큰 전사물이 다량 축적되는 것을 관찰하였다. 이 큰 전사물은 크기가 내부 M1 RNA 염기서열의 결실정도에 따라 변화되므로 *rnpB* 상위전

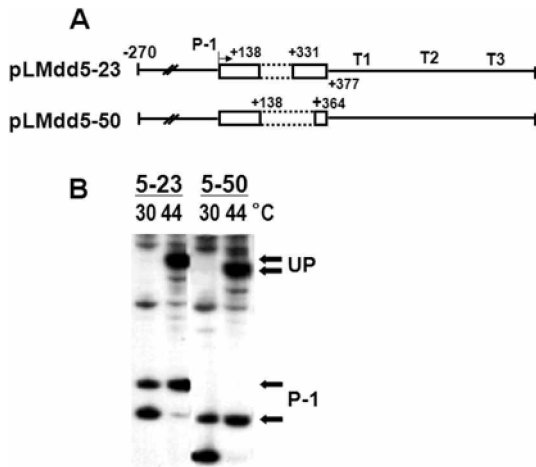


Fig. 1. Analysis of *rne* dependence of upstream transcripts containing internally deleted *rnpB* genes. (A) Schematic representation of internally deleted *rnpB* genes on plasmids pLMdd5-23 and pLMdd5-50. (B) Total cellular RNAs were prepared from MCE<sup>-</sup> cells containing the indicated plasmids, which were grown at 30 °C and 44 °C. Each RNA sample (30 μg) was fractionated on a 5% polyacrylamide gel containing 7 M urea. M1 RNA-containing transcripts were analyzed by northern blotting. Upstream transcripts and P-1 transcripts are indicated by UP and P-1, respectively.

사물이라는 것을 알 수 있다. 또한 큰 전사물은 크기가 P-1 전사물보다 약 400 nt 이상 더 크기 때문에 클로닝된 *rnpB* 유전자의 상위염기서열(P-1 전사개시 자

리에서 -270까지 염기서열) 안에서 전사가 일어나서 형성된 것이 아니라는 것을 의미한다. 그러므로 큰 전사물은 플라스미드 상의 촉진유전자에서 전사가 일어나 클로닝된 *rnpB* 유전자로 계속 전사된 전사물이라는 것을 시사한다. 이 상위전사물의 크기로 볼 때 플라스미드의 촉진유전자는 pGEM3 지도에서 약 400 위치에 존재하는 촉진유전자일 것으로 예측된다. 이 상위전사물은 허용온도인 30 °C에서 관찰되지 않았다. 이 결과는 상위전사물이 세포내에서 RNase E-의존성으로 분해된다는 것을 알 수 있다. 상위전사물은 완전한 M1 RNA의 염기서열을 가지고 있지 않기 때문에 RNase E-의존적 분해는 완전한 M1 RNA 염기서열의 존재 여부와 무관하다는 것을 나타낸다. 즉 *rnpB* 상위 전사물이 빨리 분해되기 위해서 완전한 M1 RNA 이 필요하지 않다는 것을 시사한다. *rnpB* 상위전사물이 RNase E-의존성 분해가 일어날 때 안정한 염기서열인 M1 RNA가 절단되어야 하는데 아직 어떤 자리가 RNase E에 의하여 처음에 절단이 일어나 분해가 개시되는지는 알려져 있지 않다. 본 연구 결과에서는 M1 RNA 염기서열 중 +138 ~ -360 까지의 염기서열이 결실되어도 상위전사물은 빨리 분해된다는 것을 보여 주고 있다. 그러나 같은 결실을 가진 P-1 전사물의 양은 RNase E 결핍과 무관하였다. 만약 RNase E가 상위전사물의 M1 RNA 염기서열을 절단하면서 분해가 개시된다면 절단하는 자리는 -1 ~ +138 및 -360 ~ -413 사이일 것으로 예상된다. 결실 M1 RNA

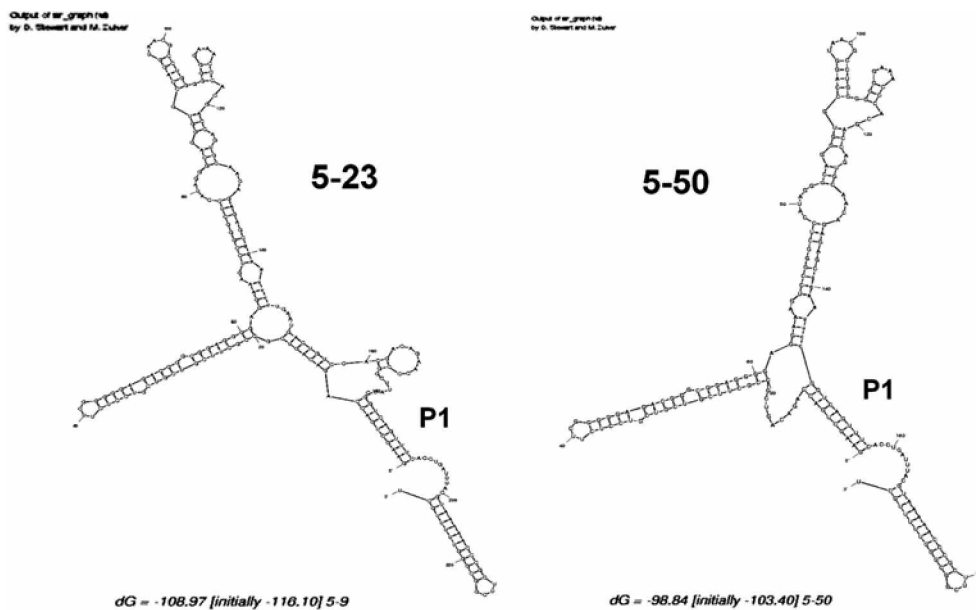


Fig. 2. Possible secondary structures of P-1 transcripts containing internally deleted *rnpB* genes. P1 stem is indicated.

의 이차구조를 RNA 이차구조 예측 프로그램으로' 그려보면 두 결실 RNA 모두 M1 RNA의 P1 줄기를 가지고 있다(Fig. 2). 이 P1 줄기는 M1 RNA의 안정성에 가장 중요한 역할을 하기 때문에 상위 염기서열이 P1 줄기를 파괴시킨다면 상위전사물의 분해를 촉진할 것으로 예측할 수 있다. 아직 RNase E 분해에 민감한 염기서열이나 구조적 특성은 더 연구가 필요하지만 이러한 M1 RNA 내부 염기서열의 결실 전략은 mpB 상위전사체가 분해될 때 RNase E에 의하여 인식되어 분해를 개시하는 염기서열과 구조를 밝히는 데 이용할 수 있을 것으로 예상된다.

## 실 험

**균주 및 플라스미드.** 사용된 대장균 RNase E<sup>3</sup> 균주 MCF (*rne-3071* K12rm<sup>-</sup>)이었다.<sup>10</sup> 플라스미드 pLMdd5-9, pLMdd5-50, pLMd23은 pLM1의 유도체이다.<sup>5,8</sup> pLM1은 *rnpB* 유전자 지도의 -270 에서 +1286 까지의 KpnI-EcoRI DNA 절편을 포함하고 있는 pGEM3의 유도체이다.<sup>11</sup> pLMdd5-9, pLMdd5-50, pLMd23은 각각 *rnpB* 구조 유전자의 +139 ~ +330, -139 ~ +363, +36 ~ -57의 염기서열이 결실되어 있다.<sup>5,8</sup>

**생체 내 RNA의 추출.** 30 °C에서 암피실린(ampicillin) 50 µg/ml을 포함하는 LB에서 밤 새 키운 대장균을 같은 배지에 1:100으로 묶힌 후  $A_{600}$ 가 0.6까지까지 진탕 배양하였다. 배양액을 둘로 나누고 하나는 30 °C에서 다른 하나는 44 °C로 계속 1 시간 동안 배양하였다. 배양액 0.7 ml 에 70 µl 의 10배 농도의 RNA 추출완충용액(RNA 추출완충용액: 0.02 M NaOAc, pH 5.2, 0.5% SDS, 1 mM EDTA)을 가한 다음 RNA 추출완충용액으로 포화된 페놀 700 µl을 가하고 65 °C에서 20분간 페놀추출을 하였다. 수용액층에 다시 700 µl의 같은 페놀을 넣고 추출한 후 같은 부피의 이

소프로필알코올을 가하여 -20 °C에서 RNA를 침전시켰다.<sup>12</sup>

**노던식 빨아들이기(Northern blot).** RNA를 7 M 우레아를 포함하는 5% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리한 후 나일론 막(Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech)로 전기이동(electrotransfer)하였다. 탐침 (probe)으로 사용된 반의미 M1 RNA(antisense RNA)는 pLMd23 DNA를 HindIII로 절단한 후 T7 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 전사반응을 통하여 얻었다.<sup>5</sup> 이때 [<sup>32</sup>P]CTP를 이용하여 RNA 내부를 <sup>32</sup>P로 표지화하였다.

## 인 용 문 헌

1. Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. *Cell* **1983**, *35*, 849.
2. Motamedi, H.; Lee, Y.; Schmidt, F. J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3959.
3. Lee, Y.; Ramamoorthy, R.; Park, C. U.; Schmidt, F. J. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5098.
4. Lundberg, U.; Altman, S. *RNA* **1995**, *1*, 327.
5. Kim, S.; Kim, H.; Park, I.; Lee, Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19330.
6. Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2856.
7. Ko, J. H.; Han, K.; Kim, Y.; Sim, S.; Kim, K. S.; Lee, S. J.; Cho, B.; Lee, K.; Lee, Y. *Biochemistry* **2008**, *47*, 762.
8. Kim, S.; Lee, Y. *FEBS Lett.* **1997**, *407*, 353.
9. Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406.
10. Carpousis, A. J.; Van Houwe, G.; Ehretsmann, C.; Krisch, H. M. *Cell* **1994**, *76*, 889.
11. Lee, Y. M.; Lee, Y.; Park, C. U. *Korean Biochem. J.* **1989**, *22*, 276.
12. Lee, S. J.; Jung, Y. H.; Park, C. U.; Lee, Y. *Mol. Cells* **1991**, *1*, 415.