

## RraB의 발현에 따른 대장균의 성장 저해의 원인 규명

류상미 · 염지현 · 고하영 · 신은경 · 이강석\*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

### Implications of Growth Arrest Induced by Overproduction of RraB in *Escherichia coli*

Sang-Mi Ryou, Ji-Hyun Yeom, Hayoung Go, Eunkyong Shin, and Kangseok Lee\*

Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea

(Received May 13, 2010/Accepted May 27, 2010)

RNase E plays a major role in the degradation and processing of a large number of RNA transcripts in *Escherichia coli* and forms the core component of the degradosome, a large protein complex involved in RNA metabolism. RraA and RraB are recently discovered protein inhibitors of RNase E and are evolutionarily conserved. In this study, we observed that, unlike RraA, overexpression of RraB did not rescue growth arrest of *E. coli* cells overexpressing RNase E. To examine whether this phenomenon stems from differential inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E substrates, we analyzed three *in vivo* RNase E substrates. The results showed that RraA inhibited RNase E activity more efficiently than RraB on the degradation of RNA I, which controls the copy number of ColE1-type plasmid, and *rpsO* mRNA encoding ribosomal protein S15, while RraB was unable to inhibit the processing of pM1 RNA, a precursor of the RNA component of RNase P, by RNase E. Our results imply that RraB inhibits RNase E activity in a more substrate-dependent manner than RraA and this property of RraB may explain why overexpression of RraB could not rescue cells overexpressing RNase E from growth arrest.

**Keywords:** degradosome, RNA stability, RNase E, RraA, RraB

세균은 mRNA의 불안정성을 통해서 외부환경 변화로 인한 세포의 생리적 필요에 따라 유전자 발현을 빠르게 조절할 수 있다. 이 과정에 관여하는 여러 인자들 중에서 대장균에 존재하는 리보핵산 내부 분해효소인 RNase E (Rne)는 세포 내 여러 RNA 전사체의 분해와 가공에 중요한 역할을 담당하고 있다(1, 14).

RNase E는 대장균에서 필수적인 효소로서 1,061개의 아미노산으로 이루어져 있으며 그 구조와 기능에 따라서 크게 세 개의 도메인(domain)으로 나눌 수 있다(11). 아미노기 말단을 포함한 단백질의 앞부분(1-498 아미노산 부분)은 효소의 활성을 갖는 도메인으로 RNA를 절단하는 기능을 가지며, 이 부분을 포함하여 498개의 아미노산만이 발현된 세포 역시 기능성을 가진다(11). 그리고 RNA가 결합할 수 있는 아르기닌(arginine)이 많이 포함된 RNA-결합 도메인(580-700 아미노산 부분)(15), 카르복실기 부분을 포함한 단백질의 뒷부분으로써 PNPase, RhlB helicase, enolase, DnaK, GroEL, PPK, poly(A)

polymerase 등의 단백질이 결합하여 데그라도솜(degradosome)을 구성하는 골격(scaffold) 도메인으로 이루어져 있다(1).

대장균에서 RNase E의 발현의 감소 또는 과발현은 세포의 정상적 성장을 방해하는 것으로 알려져 있다(2, 6, 17). 따라서 대장균 내에서 RNase E의 발현 양과 활성은 매우 엄격하게 조절된다. RNase E는 자기 자신의 mRNA를 분해하는 자기조절 기작(auto-regulation)을 통해서 mRNA 양을 조절한다(5, 12). 그리고 5' 말단의 인산기의 구조가 RNase E의 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(7). 이 두 가지 기작 외에 최근에 밝혀진 RNase E의 효소활성에 대한 단백질 저해제인 RraA와 RraB에 의한 조절이 있다. RraA와 RraB는 RNase E의 서로 다른 부위에 작용하여 활성에 영향을 미치며, 데그라도솜의 조성을 서로 다르게 변화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(3, 9).

RraA의 단백질 동족체는 Archaea, Proteobacteria, Plant 등에 널리 분포하는 한편, RraB의 동족체는 Proteobacteria에만 존재하는 것으로 보아 각각의 단백질은 RNA의 분해에 서로 특화된 기능을 갖고 있는 것으로 추측된다. 최근의 연구결과에

\* For correspondence. E-mail: kangseok@cau.ac.kr; Tel: +82-2-820-5241; Fax: +82-2-822-5241

따르면 이 단백질들은 *rne* 유전자를 결실시킨 대장균에서 방선균의 기능적 동족체인 RNase ES의 효소활성을 억제시키고 세포의 성장 저해 또한 회복시킬 수 있음을 확인 하였다(18). 그리고 이들 단백질들이 물리적으로 RNase ES와 상호작용할 수 있으며, 생체 내에서와 실험관 내에서 동일한 작용을 한다는 것을 알 수 있었다(16, 18). 그러나 이들 단백질 저해제들이 RNase E의 활성을 기질 특이적으로 테트라도솜의 구성을 바꾸는 방식을 통해 조절하는데 비해, RNase ES의 활성은 직접적인 결합에 기인하는 것으로 생각된다(16). 이 연구를 통해서 RNase E의 활성을 조절하는 조절자들은 RNase E 연관 단백질에 직접적으로 작용하는 보존된 내재적 특징이 있으며 이를 통하여 효소활성을 총체적으로 조절함을 제시한다(16, 18). 하지만, 마이크로 어레이 분석을 통한 RraA와 RraB의 RNase E에 대한 기질 특이적 저해작용에 대한 결과는 이 단백질 저해제들이 일반적으로 가지는 RNase E 관련 단백질에 대한 저해작용 외에 대장균 내에서 RNase E에 대한 특이적 저해작용이 있음을 암시한다.

본 연구에서는 RraA가 RNase E의 과발현으로 인한 성장 저해를 회복시킬 수 있었음에 반해(17) RraB를 발현 시킨 경우 오히려 RNase E가 과발현된 세포의 성장을 더욱 저해되는 것을 확인하였으며, 이는 RraB가 RraA보다는 더 기질 특이적으로 RNase E의 활성을 저해하기 때문이라고 추론할 수 있는 실험결과를 획득하였다.

## 재료 및 방법

### 균주와 플라스미드

염색체 상의 *rne* 유전자가 제거되고 RNase E의 발현을 플라스미드로 조절하는 *E. coli*의 균주인 KSL2003과 플라스미드 pKAN6, pKAN6-RraA, pKAN6-RraB에 대한 설명은 이전의 보고에서 설명하였다(17, 18).

### 플라스미드 복제수 분석

플라스미드 DNA는 생장곡선을 측정하였던 배양액에서 추출하였다. 제한효소 *NotI*으로 절단한 플라스미드는 0.9% 아가로즈 겔에서 분리하였다. 플라스미드 복제수는 Rne의 복제와 독립적으로 복제가 이루어지는 pSC101에서 유래한 pLAC-RNE2 플라스미드 양에 대한 ColE1-타입 플라스미드(pKAN6, pKAN6-RraA/B)에 대한 상대적인 비율로 계산되었다. 이때 pLAC-RNE2와 ColE1-타입 플라스미드(pKAN6, pKAN6-RraA/B)의 크기를 고려하여 플라스미드의 분자 수 비율(molar ratio)을 측정함으로써 계산하였다.

### RT-PCR

전체 RNA는 RNeasy Miniprep kit (QIAGEN, Netherland)을 사용하여 각각 생장곡선을 측정하였던 배양액에서 OD<sub>600</sub> = 0.6 일 때 추출하였다. *rpsO* cDNA의 합성은 superscript III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, USA)을 사

용하였고, 3 µg의 RNA와 *rpsO* mRNA의 특이적인 프라이머 *rpsO* 3'RT (5'-GGCCCCCTTTTCTGAAACTCG)를 사용하였다. 합성된 cDNA의 증폭은 *rpsO* 5'RT (5'-GTACACTGGGATCGCTGAATT), *rpsO* 3'RT를 사용하였다.

### Northern blot 분석

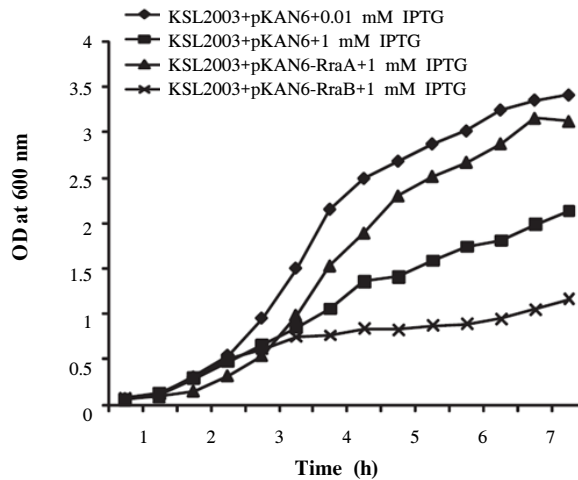
RT-PCR에 사용한 전체 RNA 20 µg에 formamide loading buffer를 넣은 뒤 70°C에서 10분간 변성시켰다. 8 M Urea가 포함된 6% acrylamide 겔에 영동시킨다. Northern blot 실험방법은 이전의 보고에서 설명하였다(8). M1 RNA의 확인에 사용한 프라이머는 M1 (5'-GCTCTCTGTTGCACTGGTGC)이다.

## 결과 및 고찰

RNase E의 과발현은 대장균의 성장을 방해하며(6), RraA를 함께 발현시키면 RNase E의 과발현에 의한 성장 저해가 회복되는 결과를 바탕으로 RNase E의 과발현에 의한 대장균의 성장 저해는 세포내 RNase E 효소활성의 증가 때문인 것으로 밝혀졌다(17).

전체 유전체 수준에서의 마이크로 어레이 분석 결과에 따르면 대장균 전체 전사체의 18% 정도가 RraA와 RraB의 영향을 받으나, 모든 RNA가 RraA와 RraB에 의해서 같은 영향을 받지 않는다(3). 이 결과는 두 개의 RNase E 단백질 저해제가 다양한 RNA의 분해와 가공에 서로 다른 작용을 함으로서 저해함을 암시한다(3, 16).

본 연구에서 KSL2003 세포에 RraB를 함께 발현 시켜서 RNase E의 발현에 단백질 저해제가 어떤 영향을 미치는지 확인해 보았다. 실험에 사용한 KSL2003 균주는 염색체상의 *rne* 유전자가 결실되었고, 세포내의 RNase E는 pLAC-RNE2 플라스미드로부터 발현이 되며, 그 발현 정도는 IPTG에 의해서 조절된다(17). 대장균에서 RNase E의 발현 정도는 세포의 성장에 큰 영향을 미치기 때문에 KSL2003 균주에서 정상적인 수준의 RNase E 발현을 위해서는 배지에 1-10 µM의 IPTG가 포함되어야 한다. 1 mM IPTG가 포함된 배지에서는 RNase E가 과발현되어 KSL2003 세포의 성장이 저해된다. KSL2003 균주에서 RraA 또는 RraB를 함께 발현시키기 위해서 pKAN6에 RraA 또는 RraB를 클로닝하여 pKAN6-RraA/B를 제작하였고(17, 18), 이 플라스미드를 KSL2003 균주 내로 삼입하여 형질 전환하였다. pKAN6-RraA/B 플라스미드로부터 RraA 또는 RraB의 발현은 아라비노스 프로모터(P<sub>BAD</sub>)에 의해 조절되며, 이 플라스미드는 kanamycin에 저항성을 가지게 하는 유전자를 포함하고 있어 RNase E를 발현시키는 pLAC-RNE2 플라스미드와 양립이 가능하다. 앞선 연구에서 1 mM IPTG와 0.2% 아라비노스로 Rne와 RraA를 함께 발현 시킨 경우에 RNase E의 과발현에 의해 저해되었던 성장이 RraA의 발현에 의해 정상수준으로 회복되는 것을 확인하였다(17). 그러나 RraB를 RNase E와 함께 과발현 시킨 결과 1 mM IPTG만을 첨가하여 RNase E의 과발현 시켰을 때의 성장 저해보다 더욱 성장이 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Effects of overproduction of RNase E and coexpression of RraA or RraB on *E. coli* growth. The cultures of KSL2003 cells harboring pKAN6, pKAN6-RraA, or pKAN6-RraB, grown in LB containing 10  $\mu$ M IPTG medium and 0.2% arabinose and no additional IPTG (KSL2003+pKAN6+10  $\mu$ M IPTG) or 1 mM IPTG (KSL2003+pKAN6+1 mM IPTG, KSL2003+pKAN6-RraA+1 mM IPTG and KSL2003+pKAN6-RraB+1 mM IPTG), were added to the cultures at OD<sub>600</sub>=0.1, and growth was monitored by analyzing cell density (absorbance at 600 nm) at indicated time intervals.

이러한 현상이 RNase E의 효소활성에 대한 RraB의 기질 특이적인 저해에 기인하는가를 알아보기 위해 RraA 또는 RraB가 세포 내 RNase E의 기질들에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 확인해 보았다. 이 실험을 위해 세포 내 RNase E의 기질로 가장 잘 연구가 되어 온 세 가지의 RNA의 상대적인 양을 분석하였다. 먼저 각각의 저해제를 발현시켰을 때 ColE1-타입 플라스미드의 복제수(copy number)를 비교하여 보았다. 대장균에서 RNase E는 플라스미드 DNA의 복제를 조절하는 안티센스 조절자인 RNA I을 분해함으로써 ColE1-타입 플라스미드의 복제수를 조절하는 것으로 알려져 있다(10). 이를 통해서 RNase E 및 RNase E 유사 단백질들의 세포 내에서의 RNA 분해 능력을 측정할 수 있으며, 이는 RNase E 효소의 RNA I에 대한 활성을 측정하는 실험에 널리 사용되어 왔다(8, 9, 17). 실험 결과 RraA를 발현시켰을 때 ColE1-타입 플라스미드인 pKAN6-RraA의 복제수는 RNase E를 과발현시켰을 때 보다 65% 감소한데 비해, RraB를 발현하였을 때 pKAN6-RraB의 복제수는 30% 감소한 것으로 나타났으며, 이 결과로 RNA I에 대한 RNase E의 효소 활성을 RraA가 RraB보다 더 효과적으로 저해하였음을 알 수 있다(Fig. 2A).

두 번째로 RNase E에 의하여 분해되는 라이보솜 단백질 S15를 코딩하는 *rpsO* mRNA (4)에 대한 RraB의 영향을 semi-quantitative RT-PCR로 확인하여 보았다. 그 결과, *rpsO* mRNA의 경우 RNase E만 과발현시켰을 때 보다 RraA를 동시에 발현시켰을 때 mRNA가 2.3배 증가한데 비해 RraB를 동시에 발현시켰을 때는 mRNA가 1.5배 증가한 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 *rpsO* mRNA의 경우 RraA가 RraB보다 효과적으로 RNase E의 활성을 저해시킬 수 있음을 확인하였다(Fig. 2B).

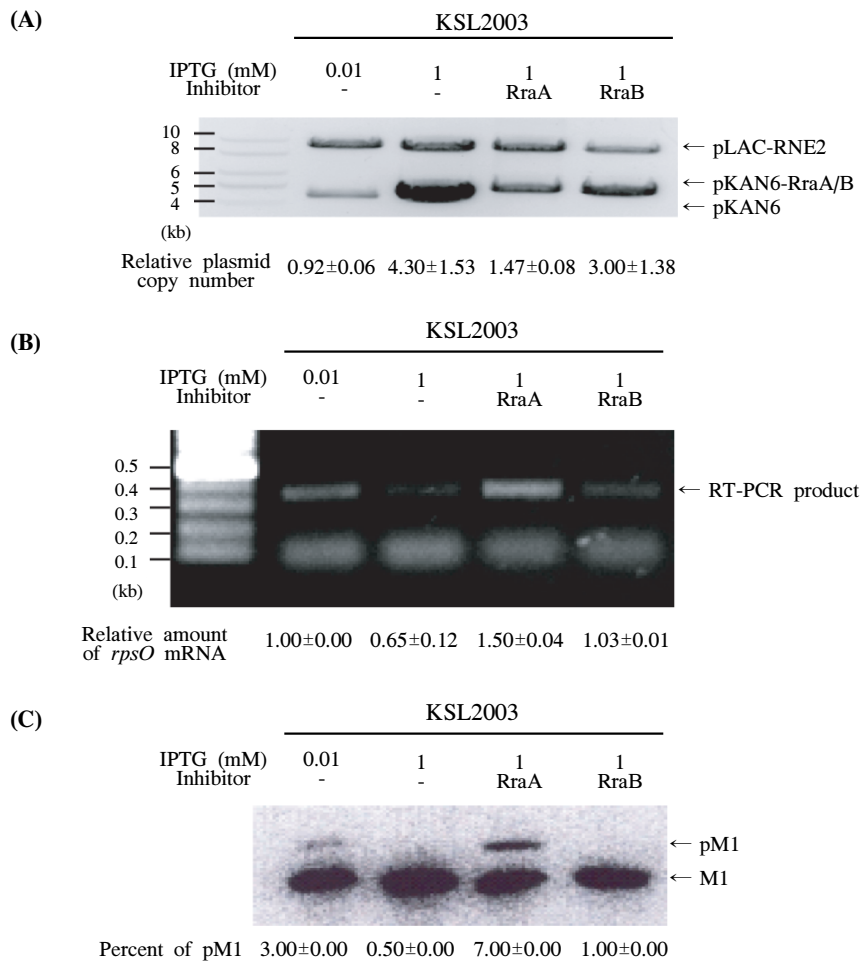
마지막으로 RNase E의 다른 기질인, RNase P의 RNA 구성요소의 전구체인 pM1 RNA (13)의 경우 RraA가 과발현 되

었을 때 pM1 RNA의 가공이 저해되는데 비해 RNase E만 과발현 되었을 때와 RraB와 RNase E가 동시에 과발현 되었을 때의 pM1 RNA의 비율이 유사함을 northern blot을 통하여 확인해 볼 수 있다. 이 결과 역시 pM1 RNA의 가공에 대한 RNase E의 활성을 RraB가 저해하지 못했음을 알 수 있다(Fig. 2C).

이 실험을 통하여 RraA와 RraB가 수많은 RNA 전사체를 분해하는 RNase E의 능력에 서로 다른 영향을 나타내는 것을 생체 내 실험을 통하여 밝혀내었으며, 이는 마이크로 어레이 결과를 뒷받침 한다(3). 단백질 저해제들에 의한 RNase E의 과발현에 따른 세포의 성장을 복구하는 것이 일관성이 없는 것은 RNase E의 활성에 RraA와 RraB가 서로 다른 영향을 미치기 때문이라고 생각된다. 이 결과는 이들 단백질 저해제들이 RNase E의 효소활성을 저해함에 있어서 각각 다른 분자수준의 조절 기작이 있음을 암시한다.

## 적요

RNase E는 대장균 내에 있는 수많은 RNA의 분해와 가공에 관여하며, 또한 RNA 대사 작용에 관련된 거대한 단백질 복합체인 데그라도솜을 구성하는 중요한 효소로 알려져 있다. RraA와 RraB는 최근에 밝혀진 RNase E의 단백질 저해제이며, 진화적으로 잘 보존되어 있다. 이 연구에서는 RraA를 발현시킬 때와는 달리 세포 내에서 RraB를 발현시키면, RNase E의 과발현에 따른 세포의 성장 저해를 회복시키지 못하고 더 저해하는 것을 확인하였다. 이 현상이 RraA와 RraB가 세포내 RNase E의 기질들에 대해 특이적으로 영향을 미치기 때문인지를 알아보기 위해 세 개의 RNase E 기질을 분석하였다. 그 결과, ColE1-타입 플라스미드의 복제수를 조절하는 RNA I과 라이보솜 단백질 S15를 코딩하는 *rpsO* mRNA의 경우 RraA가 RraB보다 효과적으로 RNase E의 활성을 저해하며,



**Fig. 2.** Effects of coexpression of RraA or RraB on ribonucleolytic activity of RNase E *in vivo*. (A) Effects of overproduction of RNase E and coexpression of RraA or RraB on copy number of ColE1-type plasmids. Plasmid DNA was isolated from the cultures used in the growth curve (Fig. 1) at  $OD_{600}=0.6$ . Plasmids were digested with *NotI* restriction enzymes, which are unique sites in pLAC-RNE2 and pKAN6, pKAN6-RraA, or pKAN6-RraB, respectively. Digested plasmid DNA was electrophoresed in 0.9% agarose gel and stained with ethidium bromide. Plasmid copy number was calculated relative to a concurrently present pSC101 derivative (pLAC-RNE2), the replication of which is independent of Rne, by measuring the molar ratio of the pLAC-RNE2 plasmid to ColE1-type plasmid (pKAN6, pKAN6-RraA, pKAN6-RraB). Densitometric measurements of bands corresponding to each plasmid were converted to actual ratios after normalizing the values according to the size of ColE1-type plasmids, and are shown at the bottom of the gel. (B) Effects of overproduction of RNase E and coexpression of RraA or RraB on abundance of *rpsO* mRNA. Relative amount of *rpsO* mRNA was normalized by setting the amount of RT-PCR product obtained from KSL2003 cells grown in the presence of 10  $\mu$ M IPTG as one, and shown at the bottom of the gel. (C) Effects of overproduction of RNase E and coexpression of RraA or RraB on processing of pM1 RNA. Percentage of pM1 RNA represents the ratio of pM1 and M1 band hybridized to the probe. Total RNA was prepared from the cultures used in the growth curve (Fig. 1) at  $OD_{600}=0.6$  and used for semi-quantitative RT-PCR (B) and Northern blot analysis (C).

RNase P의 RNA 구성요소의 전구체인 pM1 RNA에 대한 RNase E의 효소 활성은 RraB가 저해하지 못하는 것을 관찰하였다. 이 결과는 RraB가 RraA보다는 높은 기질 특이적으로 RNase E의 효소활성을 저해하며, 이러한 이유로 RNase E의 과발현에 의한 세포의 성장 저해를 RraB의 과발현으로 극복할 수 없었다고 추론할 수 있다.

### 감사의 말

이 논문은 2008년도 중앙대학교 신진우수 연구자 지원 사업

에 의한 것임.

### 참고문헌

1. Carpousis, A.J. 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71-87.
2. Claverie-martin, F., M.R. Diaz-torres, S.D. Yancey, and S.R. Kushner. 1991. Analysis of the altered mRNA stability (*ams*) gene from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 2843-2851.
3. Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C.J. Moore,

- S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2006. Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol. Microbiol.* 61, 394-406.
4. Hajnsdorf, E., F. Braun, J. Haugel-Nielsen, J. Le Derout, and P. Regnier. 1996. Multiple degradation pathways of the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* RNase E interacts with the 5' and 3' extremities of the primary transcript. *Biochimie* 78, 416-424.
  5. Jain, C. and J.G. Belasco. 1995. Autoregulation of RNase E synthesis in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 33, 85-88.
  6. Jain, C., A. Deana, and J.G. Belasco. 2002. Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 43, 1053-1064.
  7. Jiang, X. and J.G. Belasco. 2004. Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5' monophosphorylated RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9211-9216.
  8. Lee, K., J.A. Bernstein, and S.N. Cohen. 2002. RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 43, 1445-1456.
  9. Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, Y. Feng, R. Meganathan, S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2003. RraA: A protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* 114, 623-634.
  10. Lin-Chao, S., T.T. Wong, K.J. McDowall, and S.N. Cohen. 1994. Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J. Biol. Chem.* 269, 10797-10803.
  11. McDowall, K.J. and S.N. Cohen. 1996. The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* 255, 349-355.
  12. Mudd, E.A. and C.F. Higgins. 1993. *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: Autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol. Microbiol.* 9, 557-568.
  13. Reed, R.E., M.F. Baer, C. Guerrier-Takada, H. Donis-Keller, and S. Altman. 1982. Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (M1 RNA) of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Cell* 30, 627-636.
  14. Steege, D.A. 2000. Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* 6, 1079-1090.
  15. Taraseviciene, L., G.G. Bjork, and B.E. Uhlin. 1995. Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem.* 270, 26391-26398.
  16. Yeom, J.H., H. Go, E. Shin, H.L. Kim, S.H. Han, C.J. Moore, J. Bae, and K. Lee. 2008. Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 10-15.
  17. Yeom, J.H. and K. Lee. 2006. RraA rescues *Escherichia coli* cells overproducing RNase E from growth arrest by modulating the ribonucleolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1372-1376.
  18. Yeom, J.H., E. Shin, H. Go, S.H. Sim, and K. Lee. 2008. Functional implications of the conserved action of regulators of ribonuclease activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1353-1356.