

## 미세호기성 조건에서 *Escherichia coli* 에놀라아제의 발현에 있어서 RNase G의 역할에 대한 연구

심세훈<sup>1</sup> · 김용학<sup>2,3</sup> · 심민지<sup>1</sup> · 임보람<sup>1</sup> · 이강석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

<sup>2</sup>한국과학기술연구원 프로테오믹스이용기술개발사업단

<sup>3</sup>대구카톨릭대학교 의과대학 미생물학과

### Studies on the Functional Role of RNase G in the Regulation of *Escherichia coli* Enolase Expression Under Microaerobic Conditions

Se-Hoon Sim<sup>1</sup>, Yong-Hak Kim<sup>2,3</sup>, Minji Sim<sup>1</sup>, Bo-Ram Lim<sup>1</sup>, and Kangseok Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea

<sup>2</sup>Functional Proteomics Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Republic of Korea

(Received July 27, 2010/Accepted August 18, 2010)

Enolase is one of the glycolytic enzymes, which are involved in a central energy metabolism present in nearly all organisms. In *Escherichia coli*, enolase constitutes RNA degradosome with RNase E, PNPase and RNA helicase, which are involved in most mRNA degradation and RNA processing. Recently, it has been reported that RNase G, an RNase E homolog, degrades *eno* mRNA. To examine a functional role of RNase G in enolase expression which is known to be up-regulated under microaerobic condition, we carried out experiments. Here, we report that expression levels of enolase and RNase G are not correlated under microaerobic condition. Based on this observation, we suggest the existence of an unknown factor(s) which regulate the activity of RNase G or enolase mRNA under microaerobic conditions.

**Keywords:** enolase, microaerobic, RNA degradosome, RNA regulation, RNase G

에놀라아제는 Archaea, Eubacteria, Eukaryotes에 이르기까지 매우 잘 보존되어 있는 48 kDa의 단백질이며, 포도당을 피루브산으로 분해하는 해당과정에 관여하는 효소로써, phosphoenolpyruvate를 2-phosphoglycerate로 바꾸는 과정을 촉진시키는 것과 동시에 그 역과정(Gluconeogenesis)도 수행한다. *Escherichia coli*에서는 세포 내의 에놀라아제 중 10% 정도가 RNA 분해조절에 중요한 역할을 하는 RNase E의 카복실기 말단에 PNPase, RhlB와 함께 결합하여 RNA 분해복합체(degradosome)를 형성한다고 알려져 있다(1, 12). RNase E는 *E. coli*에서 대부분의 mRNA의 분해에 관여하는 것으로 알려져 있으며, rRNA, tRNA의 전구체를 가공하는 것으로 알려져 있다(2, 11). RNase G는 RNase E의 아미노기 말단(아미노산

1-469)의 촉진 부위와 34.1%의 아미노산 서열의 유사성을 가지고 있으며(9, 10), RNase E와 유사하게 5' 말단부분의 A/U-rich 부위를 선택적으로 자르지만(5, 9, 12), 분해자리는 RNase E와 다르다(8). RNase G는 RNase E 결실 돌연변이체에서 RNase E의 기능을 부분적으로 대체함으로써 세포가 성장할 수 있게 한다고 알려져 있으며, RNase E의 대표적인 기질 물질인 ColE1 type 플라스미드의 개수를 조절하는 RNAI을 자른다고 알려져 있다(7). RNase G는 RNase E와 달리 결실 돌연변이가 세포생장에 지장이 없다고 알려져 있으며(8, 13), 대표적인 기질 물질은 16.3S rRNA 전구체로써 RNase G에 의해 16S rRNA로 가공된다고 알려져 있으며(14), 알콜 분해 효소를 내재하고 있는 *adhE* 유전자와 에놀라아제를 내재하고 있는 *eno* 유전자의 mRNA가 RNase G에 의해서 분해된다는 사실이 밝혀졌고(6, 15), 이들 외에도 해당과정에 관련된 유전자들(*pgi*, *glk*, *nagB*, *acs*, *tpiA*)이 RNase G의 기질이 될 가능성이

\* For correspondence. E-mail: kangseok@cau.ac.kr; Tel: +82-2-820-5241; Fax: +82-2-825-5206

있다는 사실이 마이크로어레이 실험을 통해 밝혀졌다(7). 이러한 기질들 중 RNA 분해복합체의 구성요소이면서 당 분해 효소 중 하나인 에놀라아제는 마이크로어레이 실험에 의해 RNase G의 기질일 가능성이 밝혀졌고(7), 30°C, 정상배지 조건에서 *rng::cat* 돌연변이체의 2-D 젤 분석 및 노던 분석을 통하여 RNase G가 없으면 에놀라아제 mRNA의 안정성이 증가한다는 사실이 밝혀졌다(6). 본 연구에서는 37°C, 정상배지, 미세호기성 조건에서는 RNase G가 감소되지 않음에도 불구하고 에놀라아제 단백질이 증가한다는 사실을 발견하였으며, 이는 에놀라아제 mRNA의 조절에 RNase G 외에 다른 인자들이 작용할 수 있음을 시사한다.

## 재료 및 방법

### 균주, 배지 및 성장곡선

본 연구에서 사용된 균주는 *Escherichia coli* W3110 [F-, &lambda;-IN (rrnD-rrnE)1, rph-1] (3)와 W3110*rng* [F-, &lambda;-IN(rrnD-rrnE)1, rph-1, rng]이며, LB 배지를 사용하였다. W3110*rng* 균주는 Datsenko and Wanner (4)의 방법을 이용하였고, 프라이머 염기서열은 Lee (7)에서 사용한 5'-mg-KO (5'-GTGAGAAAAGGGATAAACATGACGGCTGAATTGTTAGTAAACGTAACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTC)와 3'-mg-KO (5'-TTACATCATTACGACGTCAAACCTGCTCCTGGTTATAGAGCGGTTCAATATTCGGGGATCCGTCGACC)를 사용하여 제작하였다. 성장 곡선은 각각 호기성, 미세호기성 조건에서 배양하여 30분마다 OD<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 미세호기성 조건은 200 ml 병에 균주를 접종한 LB 배지를 채우고 병마개를 닫은 후 자석막대를 병 바닥에서 천천히 돌리면서 배양하는 방식으로 설정하였다.

### Western blot 분석

세포를 12시간 키운 후 1/100로 희석 시켜 각각 호기성, 미세호기성 조건에서 키우고, 각각의 OD<sub>600</sub>값에서 세포를 모은 후 1 ml의 배양액을 13,000×g에서 1분 동안 원심 분리하여 세포를 모아 20 µl의 PBS (phosphate buffered saline) 버퍼에 섞은 후, 20 µl의 2× SDS-PAGE buffer (100 mM Tris-Cl; pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 30% glycerol, 200 mM β-mercaptoethanol)를 넣고 10분 동안 끓인 후, 12% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 통해 전체 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Protran®, 0.20 µm; Whatman)에 옮긴 다음, 항 에놀라아제, 항 RNase G, 항S1 항체를 이용하여 분석하였다.

### Real Time PCR

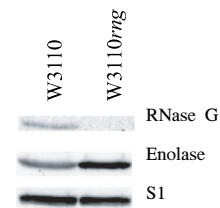
세포를 각각의 조건에서 키워 OD<sub>600</sub>=0.6이 됐을 때, 전체 RNA를 Qiagen RNeasy Kit를 사용하여 추출하였다. 추출된 전체 RNA는 정량하여 각각 1 µg의 total RNA를 주형으로 Primescript™ (TaKaRa)을 사용하여 cDNA를 만들었다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 다음의 PCR 프라이머를 이용하여

Real Time PCR을 수행하였다. 에놀라아제 분석에 사용된 프라이머는 eno+109F (5'-GCTCCGTCAGGTGCTTCTAC)와 eno+351R (5'-AGCCAGAGATACAGCCAGGA)이며, 정량 분석을 위해 사용된 프라이머는 ribE RT-F (5'-GGGTACGGTTATTCGTGGTG)와 ribE RT-R (5'-GGCCTTGATGGCTTTCAATA)이다. 같은 실험을 세번 반복하여 표준 오차를 나타내었다.

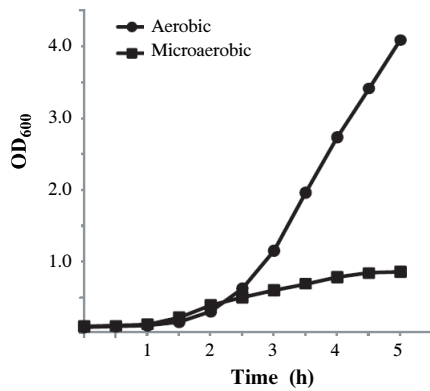
## 결과 및 고찰

RNase G는 세포 내에서 RNA 분해, 가공에 중추적인 역할을 하는 RNase E의 동족체로서 RNase E의 분해 자리와 유사한 자리를 분해시키며, RNase E의 역할을 부분적으로 대신할 수 있다고 알려져 있다. 그러나 세포내의 대다수의 RNA를 분해한다고 알려진 RNase E와는 달리, RNase G의 기질은 많이 알려져 있지 않으며 결실 되어도 세포의 성장에 영향을 주지 않는다고 알려져 있다. RNase G의 대표적인 기질은 16S rRNA 전구체이며, 현재까지 알려진 mRNA 기질은 당 분해 대사에 관여하는 몇 가지의 유전자이며, 이 중 알콜 분해 효소 (*adhE*)와 에놀라아제(*eno*)의 mRNA는 RNase G 결실 돌연변이체에서 mRNA의 안정성이 증가한다는 사실이 알려져 있다. 본 연구에서는 RNase G 결실 돌연변이체에서 에놀라아제 단백질이 실제로 증가한다는 사실을 Western Blot 실험을 통하여 확인하였다(Fig. 1). 이는 RNase G가 결실 되면 에놀라아제 mRNA의 분해가 일어나지 않아 mRNA의 양이 많아지고 따라서 에놀라아제의 단백질이 증가한다는 것을 시사한다.

RNase G가 에놀라아제의 양을 어떻게 조절하는지를 알기 위해 다양한 조건에서 에놀라아제와 RNase G의 양을 측정할 결과 미세호기성 조건에서는 RNase G의 양과는 관계없이 에놀라아제의 양이 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 미세호기성 조건에서는 세포의 성장 속도와 유도기, 증폭기, 안정기가 달라지므로 정상 조건과 미세호기성 조건에서의 세포성장 속도를 OD<sub>600</sub>으로 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 정상적인 조건과 미세호기성 조건 모두에서 OD<sub>600</sub>=0.2-0.3에서 증폭기가 시작하고 미세호기성 조건에서는 OD<sub>600</sub>=0.7이 넘어가면 안정기로 들어간다는 사실을 알 수 있었다. 미생물 성장곡선 실험을 바탕으로 증폭기인 OD<sub>600</sub>=0.3 및 0.6일 때의 RNase G와 에놀



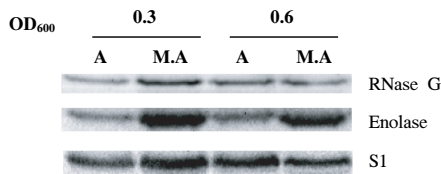
**Fig. 1.** Effects of cellular concentration of RNase G on enolase expression. Western blot analysis of RNase G and enolase. *E. coli* strains, W3110 and W3110*rng*, were cultured to OD<sub>600</sub>=0.6 and harvested for protein preparation. The S1 protein was used to provide an internal control to quantitate the amounts of total protein.



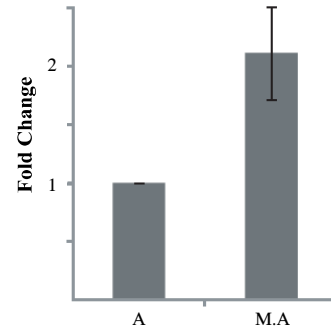
**Fig. 2.** Growth of W3110 under microaerobic and aerobic conditions. W3110 cells were grown under microaerobic or aerobic conditions and growth was measured by OD<sub>600</sub> at every 30 min.

라아제 단백질의 양을 측정하였다(Fig. 3). 미세호기성 조건에서는 피루브산이 무산소호흡을 통하여 분해되어 에너지원인 ATP를 얻게 되는데, 이러한 무산소호흡은 유산소호흡보다 효율성이 훨씬 떨어지므로 같은 에너지를 만들기 위해 더 많은 피루브산이 필요하게 되므로 에놀라아제의 양이 증가할 것으로 예측하였다. 실험결과 미세호기성 조건에서의 에놀라아제 단백질은 현저히 증가한 반면, RNase G의 단백질 양은 감소하지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 에놀라아제의 증가가 단백질의 안정성 증가에 따른 것인지, mRNA의 증가에 따른 것인지 알아보기 위하여 Real Time PCR 실험을 수행한 결과 미세호기성 조건에서 에놀라아제의 mRNA가 호기성 조건보다 두 배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 기존의 연구들에서 보고되었던 정상 조건에서의 RNase G가 에놀라아제를 분해하여 조절한다는 내용과 상반된 것이다(6).

이번 실험 결과를 통하여 에놀라아제의 조절 기작에 대한 세 가지 추측을 할 수 있다. 첫째, RNase G의 활성도를 조절하는 어떤 인자가 존재할 수 있으며, 미세호기성 조건에서는 RNase G의 활성도가 떨어져 에놀라아제의 mRNA를 분해시키지 못한다는 것이다. 둘째, RNase G 외에 *eno* mRNA의 안정성을 증가시키는 또 다른 인자가 존재하여 미세호기성 조건에서 에놀라아제의 양을 증가시킬 수 있다고 추론할 수 있다. 셋째, 미세호기성 조건에서는 에놀라아제의 전사가 증가 될 수



**Fig. 3.** Expression levels of RNase G and enolase under microaerobic condition. W3110 cells were grown under aerobic (A) or microaerobic (MA) conditions as described in the legend of Fig. 2 and harvested for total protein preparation. Western blot analysis of enolase, RNase G, and S1 was performed as described in the legend of Fig. 1.



**Fig. 4.** Relative levels of enolase mRNA under microaerobic condition. Total RNA was purified from W3110 cells grown under aerobic (A) or microaerobic (MA) conditions as described in the legend of Fig. 2 and used for quantitative analysis of *eno* mRNA using real time PCR.

있다고 추론할 수 있다. 현재로서는 에놀라아제의 전사체가 만들어지는 과정이 밝혀진 바가 없기 때문에 어떠한 인자가 연관이 되어 있는지는 찾기 어렵다.

RNase E의 분해복합체 내에서 에놀라아제의 정확한 역할은 규명되어 있지 않지만, 당 분해 인자의 mRNA 조절에 관여할 것이라는 추론들이 있으며, RNase G 역시 당 분해 인자의 mRNA를 조절 한다고 알려져 있다. 위의 두 종류의 당 분해 조절 인자들의 관계에서 RNase G가 *eno* mRNA를 분해 시킨다는 사실이 보고 되어있고, 이번 실험에서는 에놀라아제의 조절에 또 다른 인자들이 중요하게 작용할 수 있음을 시사한다. 따라서 에놀라아제의 조절이 생명체의 중추적인 에너지원인 당의 분해 조절에 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 추론할 수 있다.

### 적요

에놀라아제는 대부분의 생명체에서 에너지 대사에 중추적인 기능을 하는 해당과정에 관여하는 효소이며, *Escherichia coli*에서 RNA 가공 및 분해에 중심적인 역할을 하는 RNase E와 PNPase, Helicase와 함께 RNA 분해 복합체를 형성한다고 알려져 있다. *E. coli*에서 에놀라아제의 mRNA는 RNase E의 동족체인 RNase G에 의해 잘려서 분해되어 조절 된다고 알려져 있다. 산소가 없는 환경에서 과발현되는 것으로 알려진 에놀라아제의 발현에 있어서 RNase G의 역할을 알아보기 위하여, 연구를 수행한 결과, 미세호기성 조건에서는 에놀라아제와 RNase G의 발현양 사이에는 상관관계가 밝혀내었다. 이러한 연구결과는 미세호기성 조건에서는 RNase G 이외에 에놀라아제의 조절에 기여하는 다른 기작이 있을 수 있다는 것을 시사한다.

### 감사의 말

이 논문은 한국학술진흥재단 기초연구과제지원사업(KRF-2007-313-C00661)의 지원에 의한 것임.

## 참고문헌

1. Chandran, V. and B.F. Luisi. 2006. Recognition of enolase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J. Mol. Biol.* 358, 8-15.
2. Coburn, G.A. and G.A. Mackie. 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 55-108.
3. Dasgupta, S., L. Fernandez, L. Kameyama, T. Inada, Y. Nakamura, A. Pappas, and D.L. Court. 1998. Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III - the effect of dsRNA binding on gene expression. *Mol. Microbiol.* 28, 629-640.
4. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645.
5. Jiang, X., A. Diwa, and J.G. Belasco. 2000. Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J. Bacteriol.* 182, 2468-2475.
6. Kaga, N., G. Umitsuki, K. Nagai, and M. Wachi. 2002. RNase G-dependent degradation of the *eno* mRNA encoding a glycolysis enzyme enolase in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2216-2220.
7. 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.
8. Li, Z., S. Pandit, and M.P. Deutscher. 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18, 2878-2885.
9. Mackie, G.A. 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* 395, 720-723.
10. McDowall, K.J., R.G. Hernandez, S. Lin-Chao, and S.N. Cohen. 1993. The *ams-1* and *rne-3071* temperature-sensitive mutations in the *ams* gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli mre* locus. *J. Bacteriol.* 175, 4245-4249.
11. Ow, M.C., Q. Liu, and S.R. Kushner. 2000. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol. Microbiol.* 38, 854-866.
12. Regonesi, M.E., M. Del Favero, F. Basilico, F. Briani, L. Benazzi, P. Tortora, P. Mauri, and G. Dehò. 2006. Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie* 88, 151-161.
13. Tock, M.R., A.P. Walsh, G. Carroll, and K.J. McDowall. 2000. The CafA protein required for the 5'-maturation of 16S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad sequence specificity. *J. Biol. Chem.* 275, 8726-8732.
14. Wachi, M., G. Umitsuki, M. Shimizu, A. Takada, and K. Nagai. 1999. *Escherichia coli cafA* gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 483-488.
15. Wachi, M., N. Kaga, G. Umitsuki, D.P. Clark, and K. Nagai. 2001. A novel RNase G mutant that is defective in degradation of *adhE* mRNA but proficient in the processing of 16S rRNA precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1301-1306.