

Bacillus subtilis DEAD-Box RNA Helicase 유전자 결손 균주들의 저온 민감성 생장

오은하 · 이상수*
배재대학교 생명공학과

Cold-Sensitive Growth of *Bacillus subtilis* Mutants Deleted for Putative DEAD-Box RNA Helicase Genes

Eun Ha Oh and Sang Soo Lee*

Department of Life Science and Technology, Pai Chai University, Daejeon 302-735, Republic of Korea

(Received July 30, 2010/Accepted September 14, 2010)

Four genes (*yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *deaD*) were identified as putative DEAD-box RNA helicase genes in the genomic sequence of *Bacillus subtilis* by homology search. To understand the function of these genes, each of the genes was deleted and the constructed strains were tested for their growth characteristics at different temperatures. The growth rate of *ydbR* deletion mutant ($T_d=53$ min) was a little bit reduced at 37°C as compared to that of wild type strain (CU1065). But the growth rate of other three (*yqfR*, *yfmL*, *deaD*) deletion mutants ($T_d=30-40$ min) is nearly equal to the growth rate of wild type ($T_d=32$ min). On the other hands, the growth rate of deletion mutants were reduced at 22°C in order of *yqfR* ($T_d=151$ min), *yfmL* ($T_d=214$ min), *ydbR* ($T_d=343$ min), which showed cold-sensitive phenotype. The deletion mutant of *deaD* ($T_d=109$ min) grew equally as compared to the growth rate ($T_d=102$ min) of the wild type at 22°C and did not show cold-sensitive growth. Double, triple and quadruple deletion mutants of these genes were constructed, and growth rate of these mutants were measured at various temperature conditions (22°C, 37°C, 42°C) using LB broth. Multiple deletion mutations showed more severe cold-sensitive growth than single deletion mutations, and double deletion of *ydbR* and *yfmL* ($T_d=984$ min) showed most cold-sensitive growth than any other double mutants. Such a cold-sensitive growth of these mutations is quite similar to the result of *csdA* or *srmB* deletion in *E. coli* and suggested that physiological role of *ydbR* and *yfmL* is related with ribosome assembly.

Keywords: *B. subtilis*, cold-sensitive, DEAD-box RNA helicase, ribosome

RNA 대사는 모든 세포에서 일어나고 매우 오래 전부터 진화되어 온 생체 과정이다. 대부분의 생물에서 DEAD-box 패밀리의 RNA helicase들이 발견되었고(9) RNA 대사에서 중요한 역할을 담당하고 있다(5, 6, 16, 18). 이들은 RNA 합성에서 분해에 이르는 대부분의 과정과 관련이 있다. RNA 2차 구조변화는 번역, 리보솜 생합성, RNA 스플라이싱, RNA maturation을 포함하는 여러 과정에서 기본적으로 필요하고, 대부분의 생물체에서 존재하는 RNA helicase에 의해 진행된다. 이들은 일반적으로 RNA에 의해 유도되는 ATPase 활성을 나타내며, ATP 분해에서 생성되는 에너지를 사용하여 RNA-단백질 복합체 결합, RNA 분자와 분자 사이의 결합 및 분자내의 결합을

와해시킨다(8, 17). 특히 이들은 9개의 잘 보존된 구역으로 구성되어 있으며, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 도메인을 가지고 있어 DEAD-box RNA helicase라 명명된다(5, 16).

잘 연구된 *E. coli*의 DEAD-box RNA helicase는 모두 5종 류로(DbpA, RhlB, SrmB, CsdA, RhlE) RNA에 유도되는 ATPase와 RNA 이중 나선을 분리시키는 helicase 활성을 보인다(14). 이들의 기능을 살펴보면 DbpA는 리보솜 생합성(20), RhlB는 mRNA 분해(2, 13, 15), SrmB와 CsdA는 리보솜 조립에 관여한다(16, 17). SrmB 혹은 CsdA가 결손되면 낮은 온도에서 잘 자라지 않는 저온 민감성 생장의 표현형을 보인다(3, 4). DbpA는 유일하게 특이적인 RNA 모티프인 23S rRNA 92개의 염기로 이루어진 헤어핀과의 결합을 통해 활성화되는 RNA helicase이다(19). 최근에 이 헤어핀 92와의 결합은 DbpA의 C-말단 부위의 도메인이 관여하고(7), 이들의 결합으로

* For correspondence. E-mail: sslee@pcu.ac.kr; Tel: +82-42-520-5616; Fax: +82-42-520-5445

helicase 활성을 촉진시키는 것으로 알려졌다. 흥미롭게도 *B. subtilis*의 DeaD (YxiN) DEAD- box RNA helicase의 C-말단 도메인은 헤어핀 92와 결합하며(12, 22) 이 도메인이 *E. coli*의 DbpA의 N-말단과 연결되어도 그 결합이 일어나는 것으로 보아 이 도메인들은 모듈화 되어 있다고 생각된다(12).

세균의 DEAD-box RNA helicase들은 15-25°C의 낮은 온도에서 RNA의 2차구조의 형성이 잘 일어날 수 있도록 한다. 이 RNA helicase 유전자가 결손되면 낮은 온도에서 RNA 2차구조의 형성이 잘 일어나지 않아 세포의 생장에 영향을 미친다(3, 4). 특히 *E. coli*의 CsdA는 낮은 온도에서 발현되며 결손되면 낮은 온도에서의 생장은 느려진다. 반면에 *B. subtilis*의 DEAD-box RNA helicase 유전자들은 잘 알려져 있지 않고 그 기능 또한 밝혀져 있지 않다(1, 11).

본 연구에서는 *Bacillus subtilis*를 대상으로 DEAD-box RNA helicase 유전자를 조사하였다. 이 결과 4종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자를 찾아내어 이들 각각이 9개의 잘 보존된 DEAD-box RNA helicase 구역을 확인하였다. 4종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자는 *yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *deaD*이며 이들 유전자들을 각각 결손시켜 저온에서의 생장하는 정도를 측정하여 이들 유전자의 생리적인 기능에 대하여 알아보고자 하였다. 나아가 2개, 3개, 4개의 RNA helicase들이 결손된 돌연변이들을 제조하고 이들의 저온에서의 생장을 측정하였다.

재료 및 방법

박테리아, 배양액과 성장 조건

*B. subtilis*는 CU1065 (W168 *attSPβ trpC2*)를 사용하였으며 LB 배지에서 배양하여 형질전환하는데 이용하였다. 성장 조건은 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 여러 *B. subtilis* 균주의 선별을 위해 사용한 항생제는 spectinomycin (100 µg/ml), kanamycin (10 µg/ml), erythromycin (1 µg/ml) lincomycin (25 µg/ml) (macrolide-lincosamide-streptogram B 저항성 시험), chloramphenicol (10 µg/ml)이다.

CU1065 유전체 DNA 정제

B. subtilis CU1065를 5 ml LB 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 12시간 동안 진탕 배양한 후 1 ml 정도를 1.5 ml 튜브에 넣고 8,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 하여 상층 액을 버리고 세포침전물을 얻는다. 이를 200 µl TE buffer에 (10 mM Tris pH 8.0 / 1 mM EDTA) 넣고 세포를 녹인 후, 20 µl lysozyme (10 mg/ml)과 1 µl RNaseA (10 mg/ml)를 넣어주고 37°C에서 30분 동안 배양한다. 500 µl의 lysis buffer [40 mM Tris acetate (pH 7.8), 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 1% SDS]를 넣고 천천히 잘 섞어주었다. 5 M NaCl을 500 µl 넣고 다시 섞어준 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 한다. 흰색의 침전물이 따라서 나오지 않도록 조심하게 상층 액을 새로운 튜브에 옮긴 후, 동량의 아이소프로판올을 넣고 10초 동안 원

Table 1. Oligonucleotide sequence used for LFH-PCR

	Oligonucleotide sequence
YfmL UpF	5'- CGGTGACATCTCGCTCTAAA -3'
YfmL Up-mls R	5'- GAGGGTTGCCAGAGTTAAAGGATCAGCCGGAAGCATTCCAATTC -3'
YfmL Dn-mls F	5'- CGATTATGTCTTTTGCAGATCGGCGTGCTGAGCCTTGTGACAAA -3'
YfmL Dn R	5'- ACATTCCTGACGCGTTTCTC -3'
Mls F	5'- GATCCTTTAACTCTGGCAACCCTC -3'
Mls R	5'- GCCGACTGCGCAAAAGACATAATCG -3'
YqfR Up F	5' -CCTCATTGGCCTCTGTCT -3'
YqfR Up-kana R	5'-CCTATCACCTCAAATGGTTTCGCTGCAAGGCGATGTACTGCATCT -3'
YqfR Dn-kana F	5'- CGAGCGCTACGAGGAATTTGTATCGAAGCCGAAGAAGGTTAAGCC -3'
YqfR Dn R	5'-AGCACTCCGTCAAAGTCTTC-3'
Kana F	5'-CAGCGAACCATTTGAGGTGAT-3'
Kana R	5'-CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCG-3'
DeaD Up F	5'-GATGCTGCCTCACTATATCG-3'
DeaD Up-cat R	5'-CTTGATATTAAGGGTAACTATTGCCAGTCCTTCCAATGCTCGTA-3'
DeaD Dn-cat F	5'-GGGTAAGTACGCTCGCCGGTCCACGTGGTAAAGGCCCTCATGTTTC-3'
DeaD Dn R	5'-CGATGAAACGGATCAGGCAA-3'
Cat-fwd	5'- CGGCAATAGTTACCTTATTATCAAG-3'
Cat-rev	5'- CCAGCGTGGACCGGCGAGGCTAGTTACCC-3'
YdbR Up F	5'-GACAGAAAGCCTTGAAGGCT-3'
YdbR Up-spec R	5'-CGTTACGTTATTAGCGAGCCAGTCTGCTTCTTCAAATCCCATACG-3'
YdbR Dn-spec F	5'-CAATAAACCTTGCCTCGCTACGGGAAAAGCAACAACCGTTC-3'
YdbR Dn R	5'- CAGACATCATCGTCAGTCAC -3'
Sepe F	5'-GACTGGCTCGCTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG-3'
Sepe R	5'-CGTAGCGCAAGGGTTTATTGTTTCTAAAATCTG-3'

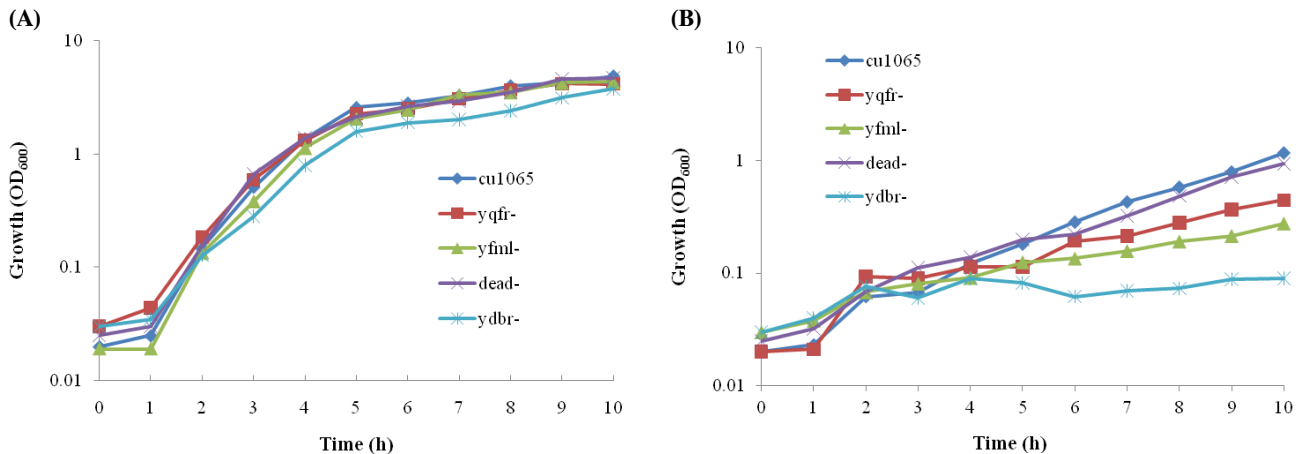


Fig. 2. Effects of putative DEAD-box RNA helicase single gene deletion on growth of *B. subtilis* strains Cu1065 (wt) and *yqfR*, *yfmL*, *dead*, *ydbR* at different temperatures. Cells were incubated in liquid LB medium at 37°C (A), 22°C (B) and growth was monitored at OD₆₀₀. Each growth curve represents the average of two independent experiments.

LB 배양액에서의 세포 성장 측정

하루 전에 LB 배양액으로 야생형 균주인 CU1065와 *yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *dead* 유전자의 결손 균주들을 O.D₆₀₀=0.6으로 키운다. 250 ml 삼각플라스크에 LB 배양액을 30 ml 넣은 후 각각의 삼각플라스크에 같은 세포의 양으로(OD₆₀₀=0.6) 접종하고 37°C와 22°C에서 진탕 배양하는 동안 한 시간에 한 번씩 세포의 OD₆₀₀값을 측정하였다.

결과

이미 잘 연구되어 있는 *E. coli* DEAD-box RNA helicase 유전자와 상동성을 보이는 유전자를 *B. subtilis*의 전체 유전자에서 찾아보았다. 이 결과 *yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *dead*의 4 종류의 유전자가 확인되었다. 이들 모두 9개의 상동성을 나타내는 구역(Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI) Fig. 1에서와 같이 찾을 수 있었고, 이것은 이들 유전자가 DEAD-box RNA helicase임을 보이는 특징이라 할 수 있다(5, 16). Q, I, II 구역은 ATP에 결합하여 가수분해하는 부분이고, III 구역은 ATP 가수분해에 의한 RNA가 unwinding되는데 관여한다. VI 구역 역시 ATP 결합에 관여하고 다른 구역은(Ia, Ib, IV, V) RNA결합에 관여한다. 다섯 종류의 *E. coli* DEAD-box RNA helicase 유전자들과 네 종류의 *B. subtilis* DEAD-box RNA helicase들의 아미

노산 서열의 상동성을 조사하였다(Table 2). 이들 사이의 상동성은 26-39%의 상동성을 보이며, 가장 높은 상동성은 *E. coli*의 CsdA와 *B. subtilis*의 YdbR로 39%를 보인다. 이들 사이의 상동성 조사에서 서로 기능이 유사한 것끼리 연결할 만큼 상동성에서 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었으나, 가장 상동성이 높은 *E. coli*의 CsdA와 *B. subtilis*의 YdbR는 기능이 유사할 것으로 생각된다.

생체 내에서의 DEAD-box RNA helicase 유전자들의 기능을 알아보기 위하여 상동 재조합을 이용하여 이들 유전자들을 결손시켰다. 이들 결손에서 사용된 항생제 선별 표지자는 spectinomycin, kanamycin, erythromycin/lincomycin chloramphenicol으로 각각은 *ydbR*, *yqfR*, *yfmL*, *dead* 유전자들을 결손 시키는데 이용하였다. 각각의 DEAD-box RNA helicase 유전자가 결손된 돌연변이체들을 37°C와 22°C에서 LB 배양액으로 키워 성장곡선을 그렸다. Fig. 2에서와 같이 37°C에서 *ydbR*를 제외한 모든 돌연변이체들은 CU1065와($T_d=32$ min) 비슷한 성장곡선으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다($T_d=30-40$ min). 다만 *ydbR*은 약간 느리게 성장하였다($T_d=53$ min). 반면에 22°C에서는 대부분의 돌연변이체들은 성장속도가 매우 느려졌다. 가장 느린 성장을 보이는 돌연변이체는 *ydbR* ($T_d=343$ min)이고, *yfmL* ($T_d=214$ min), *yqfR* ($T_d=151$ min), *dead* ($T_d=109$ min) 순으로 생장이 느려졌다. *dead*는 22°C에서도 CU1065와($T_d=102$ min) 비슷할 정도로 성장하는 것을 확인하였다.

두 종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자가 결손된 6가지 돌연변이체들을(*yfmL yqfR*, *yfmL dead*, *yfmL ydbR*, *yqfR dead*, *yqfR ydbR*, *dead ydbR*) 제조하였고, 이들의 생장을 42°C, 37°C, 22°C에서 LB 배양액을 사용하여 측정하였다(Fig. 3). 측정 결과 모든 이중 돌연변이체들은 42°C에서 CU1065 ($T_d=24$ min) 보다 거의 유사하거나 미약하게 느린 성장속도를 보였다($T_d=25-29$ min). 37°C에서는 *yfmL ydbR* 돌연변이체를($T_d=43$ min) 제외하고 나머지 5가지 이중 돌연변이체

Table 2. Comparison of amino acid sequence homology of DEAD-box RNA helicases in *B. subtilis* and *E. coli*

<i>E. coli</i> \ <i>B. subtilis</i>	<i>ydbR</i>	<i>yqfR</i>	<i>dead</i>	<i>yfmL</i>
<i>dbpA</i>	38%	27%	36%	26%
<i>smB</i>	33%	29%	30%	30%
<i>csdA</i>	39%	31%	38%	30%
<i>rhlE</i>	35%	30%	34%	31%
<i>rhlB</i>	34%	31%	31%	27%

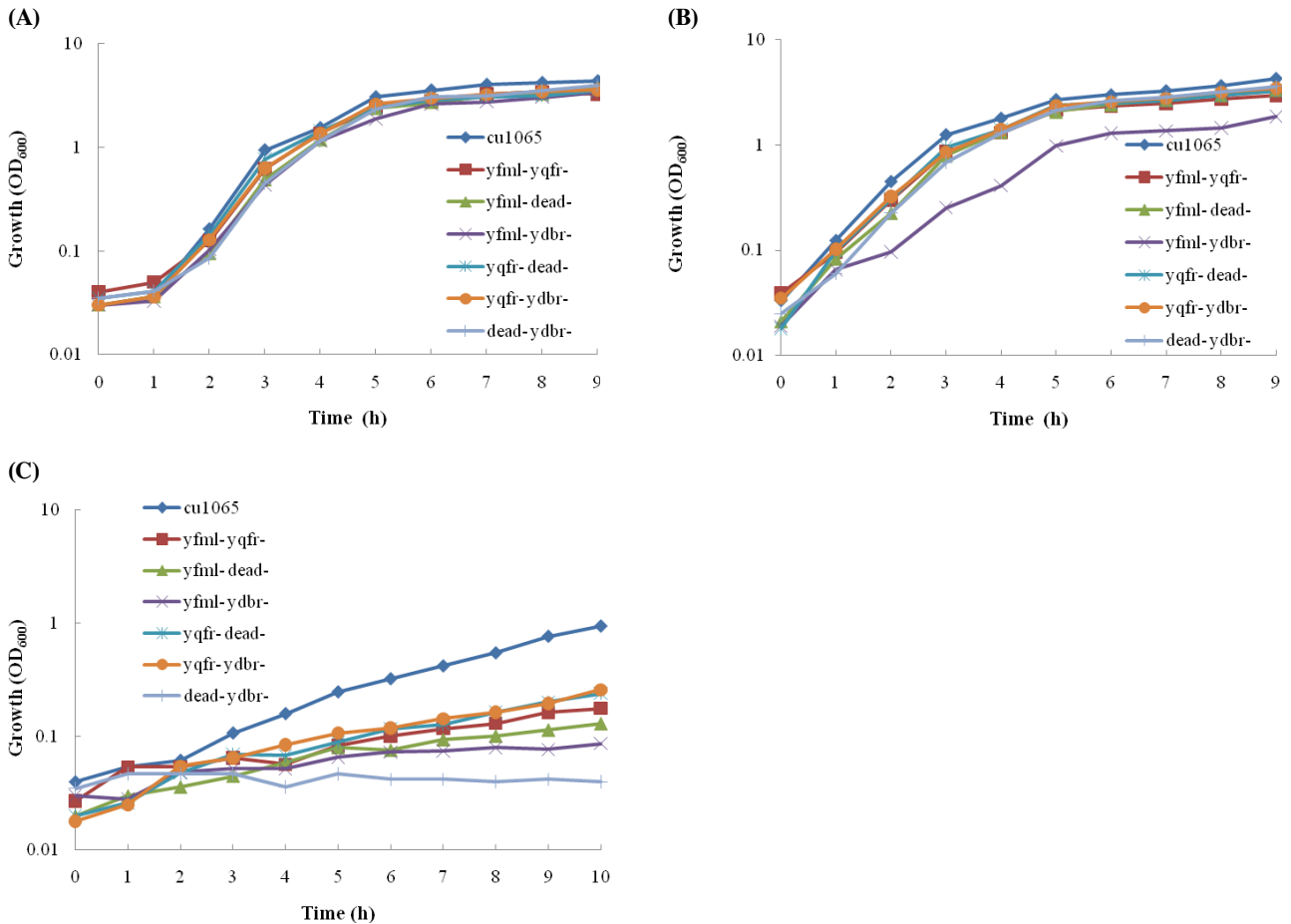


Fig. 3. Effects of putative DEAD-box RNA helicase double gene deletion on growth of *B. subtilis* strains Cu1065 (wt) and *yfmL*⁻*yqfR*⁻, *yfmL*⁻*deaD*⁻, *yfmL*⁻*ydbR*⁻, *yqfR*⁻*deaD*⁻, *yqfR*⁻*ydbR*⁻, *deaD*⁻*ydbR*⁻ at different temperatures. Cells were incubated in liquid LB medium at 42°C (A), 37°C (B), 22°C (C) and growth was monitored at OD₆₀₀. Each growth curve represents the average of two independent experiments.

들은 CU1065와($T_d=32$ min) 거의 유사한 성장속도를 보였다 ($T_d=32-36$ min). 22°C에서는 CU1065 야생형 균주 이외의 모든 이중 돌연변이체들의 성장속도는 매우 느렸다.

세 종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자가 결손된 4가지 돌연변이체들과(*yfmL*⁻*yqfR*⁻*deaD*⁻, *yfmL*⁻*yqfR*⁻*ydbR*⁻, *yfmL*⁻*deaD*⁻*ydbR*⁻, *yqfR*⁻*deaD*⁻*ydbR*⁻) 4종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자가 결손된 돌연변이체를 제조하였고 이들의 생장을 42°C, 37°C, 22°C에서 LB 배양액을 사용하여 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 42°C에서는 CU1065 ($T_d=22$ min)보다 약간 느리게 성장하지만($T_d=28-43$ min) 37°C 그리고 22°C로 온도가 내려가면서 CU1065보다 느린 성장을 보였다. 37°C에서는 이들 4가지 돌연변이체들의 성장속도가 CU1065보다($T_d=32$ min) 다소 느려졌고, 이중 *yfmL*⁻*deaD*⁻*ydbR*⁻의 성장속도가 ($T_d=99$ min) 가장 느렸다. 오히려 4종류의 DEAD-box RNA helicase 유전자가 결손된 돌연변이체는($T_d=35$ min) *yfmL*⁻*deaD*⁻*ydbR*⁻의 성장속도보다 빠르고 나머지 3종류의 돌연변이체의 성장속도와 유사하였다. 22°C에서는 이들 모든 삼중 사중 돌연변이체들은 거의 성장하지 못하는 것을 확인하였다.

고찰

잘 알려진 *E. coli*의 DEAD-box RNA helicase 단백질은 400여 개의 아미노산으로 이루어지며 특히 9개의 상동성이 매우 잘 보존된 부분을 가지고 있다(5, 16). *B. subtilis*에서 이와 같은 상동성을 나타내는 유전자를 4종류 확인 하였으며, 이들 모두 9개의 상동성 부분이 잘 보존되어 DEAD-box RNA helicase의 특징을 보이고 있다. 이들 종간의 상동성은 26-39%를 보이며 가장 높은 상동성은 *E. coli*의 CsdA와 *B. subtilis*의 YdbR사이의 39% 상동성을 보인 경우이다. 다섯 종류의 *E. coli*의 DEAD-box RNA helicase들은 필수적인 단백질이 아니다. *rhlB*, *rhlE*, *dbpA*들의 유전자는 결손되어도 세포 성장에 어떤 영향도 보이지 않는다. 다만 *csdA* 혹은 *srmA*의 결손은 낮은 온도에서 성장속도가 느려지는 저온 민감성을 나타낼 뿐이다(3, 4). 반면에 효모인 *Saharomyces cerevisiae*는 대부분의 DEAD-box 단백질들은 필수적이다(11). 리보솜 조립에 관여하는 것으로 확인된 *csdA*는 저온 민감성을 보인다. *B. subtilis*의 DEAD-box RNA helicase 유전자 결손 돌연변이체들의 저온

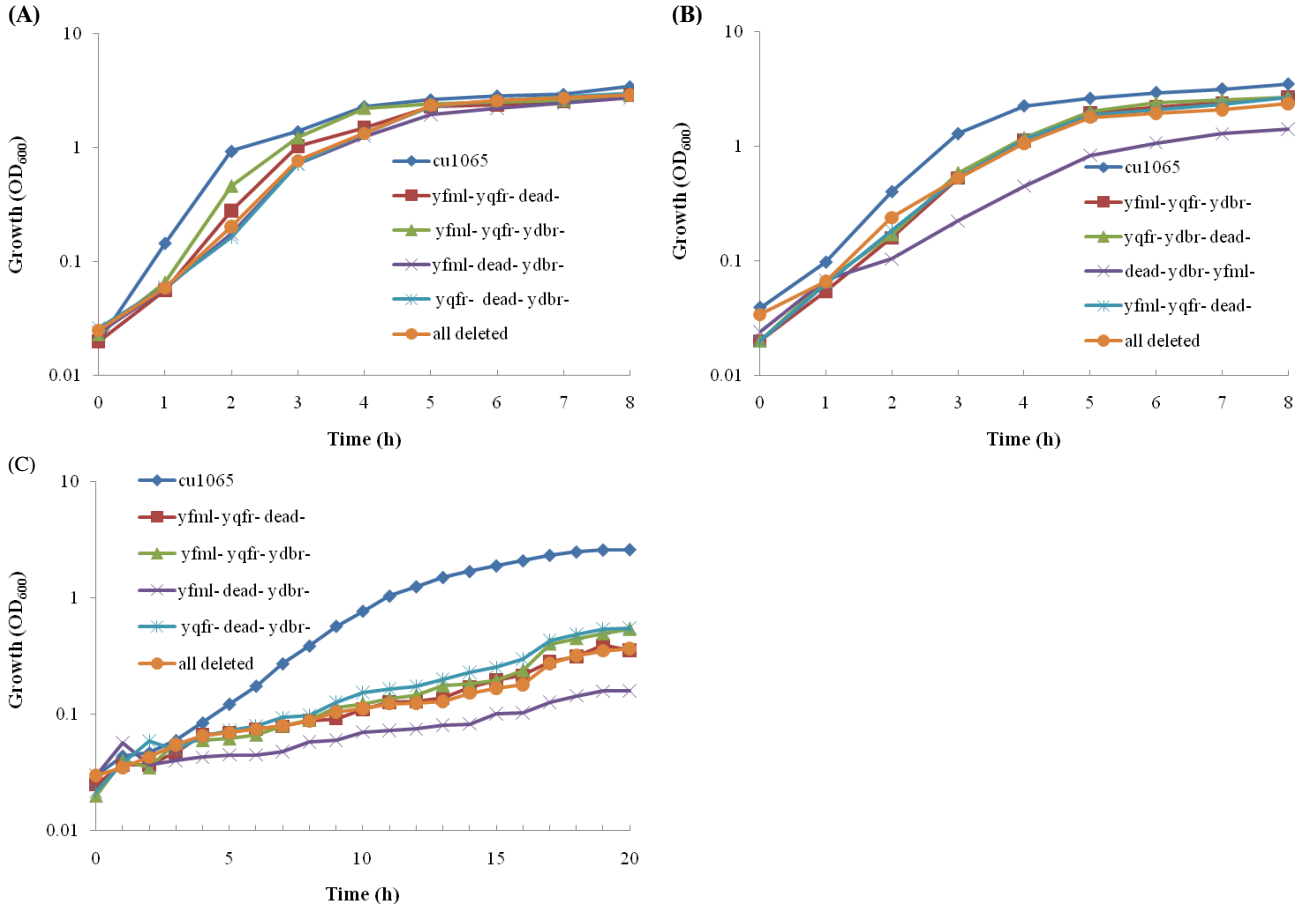


Fig. 4. Effects of putative DEAD-box RNA helicase triple and quadruple gene deletion on growth of *B. subtilis* strains Cu1065 (wt) and *yfmL yqfR deaD*, *yfmL yqfR ydbR*, *yfmL deaD ydbR*, *yqfR deaD ydbR*, *yqfR deaD ydbR yfmL* at different temperatures. Cells were incubated in liquid LB medium at 42°C (A), 37°C (B), 22°C (C) and growth was monitored at OD₆₀₀. Each growth curve represents the average of two independent experiments.

민감성 실험에서 낮은 온도에서 성장하는 속도가 가장 느린 것은 *ydbR* 이고 리보솜과 같이 세포 내에 존재하는 것으로 보고된 바 있다(1). 따라서 *ydbR* 이 매우 온도에 민감하고 세포 내의 위치가 리보솜과 같은 곳으로 보아 그 기능이 리보솜의 조립이나 생합성에 관련할 것으로 예상된다. *B. subtilis*의 DEAD-box RNA helicase 유전자를 결손시켜 저온 민감성을 조사한 결과 *ydbR*, *yfmL*, *yqfR* 순으로 저온 민감성을 보였으며 *deaD*는 단독으로 결손될 경우 CU1065와 거의 성장속도가 비슷하여, 저온 민감성을 나타내지 않았고 이는 보고된(3, 4) *E. coli*의 *dpbA*의 결과와도 유사하다(Fig. 2). 또한 *DeaD*와 *DbpA* 둘 다 RNA 모티브인 23S rRNA 92개의 염기로 이루어진 헤어핀과의 결합을 통해 활성화되는 RNA helicase로 알려져(19) *DeaD*의 기능이 *DbpA*의 기능과 같은 리보솜 생합성에 관련될 것으로 추정된다. 이중의 *E. coli* DEAD-box RNA helicase 결손이 단일 결손에 비해 낮은 온도에서 성장하는 속도는 거의 유사한 것으로 보고되었다(11). 하지만 두 종류 혹은 세 종류 이상의 *B. subtilis* DEAD-box RNA helicase 결손은 단일 결손에 비해 저온 민감성 생장이 심해진다(Figs. 2, 3, 4). 두 종류의 RNA helicase가 결손될 경우 저온 민감성이 가

장 심한 *ydbR*과 *yfmL*의 조합에서 37°C에서도 성장속도가 제일 느렸다(Fig. 3). 이는 단독 결손의 결과에서도 *ydbR*, *yfmL* 순으로 저온 민감성을 보이는 결과와 일치하고 있다. 따라서 *E. coli*에서 저온 민감성 생장을 보이는 *csdA*와 *srmB* 유전자의 생리적 기능은 *ydbR*과 *yfmL*과 유사할 것으로 생각된다. 세 종류의 RNA helicase가 결손될 경우 저온 민감성이 제일 큰 경우는 *yfmL deaD ydbR*이었고, 오히려 네 종류의 RNA helicase 모두 다 결손된 것보다도 37°C에서 성장속도가 느렸다(Fig. 4). 이는 RNA helicase의 생리적인 기능 면에서 살펴볼 때 *DeaD*는 리보솜 생합성에 관여하며, *YfmL*과 *YdbR*은 리보솜 조립에 관여하여 이들 세 유전자들이 결손되면 낮은 온도에서의 리보솜의 작용에 심각한 결함이 발생할 수 있어 저온 민감성이 제일 큰 것으로 생각된다. 오히려 *YqfR* RNA helicase의 기능은 리보솜과는 관계없는 다른 부분에 작용하여 저온 민감성을 회복시키는 쪽으로 영향을 주었다고 생각된다. 앞으로의 연구를 통하여 이들 RNA helicase들의 상호 보완이 가능한지 알아 볼 수 있을 것이고 이를 통하여 생리적인 기능을 파악하고자 한다.

적요

*Bacillus subtilis*에 존재하는 DEAD-box RNA helicase에 대한 유전자 상동성 검색을 통해 *yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *deaD*의 4종류의 유전자를 확인하였고 이들 유전자 각각의 결손 돌연변이체를 제조하였다. 이들 돌연변이체들의 특성을 알아보기 위하여 LB 배양액을 사용하여 여러 온도에서의 성장 속도를 조사하였다. LB 배양액에서 37°C의 성장 결과 *ydbR* 결손 균주가 다소 생장이 느려지나($T_d=53$ min) 다른(*yqfR*, *yfmL*, *deaD*) 결손 돌연변이체들은($T_d=30-40$ min) 결손이 없는 야생형 균주 CU1065와($T_d=32$ min) 유사하였다. 반면에 22°C에서의 생장은 CU1065 ($T_d=102$ min)에 비해 *yqfR* ($T_d=151$ min), *yfmL* ($T_d=214$ min), *ydbR* ($T_d=343$ min) 결손 균주 순으로 성장속도가 느린 저온 민감성을 보인다. *deaD*의 22°C에서의 성장 속도는 ($T_d=109$ min) CU1065와 ($T_d=102$ min) 매우 유사하여 저온 민감성을 보이지 않았다. 그리고 이들 유전자들의 이중, 삼중, 사중의 결손 균주들을 제조하였고, 여러 온도에서 (42°C, 37°C, 22°C) LB 배양액을 사용하여 성장 속도를 측정하였다. 다중 결손은 단일 결손보다 더 심한 저온 민감성을 보이며, 이중 결손의 경우, *ydbR*과 *yfmL*의 결손이 다른 조합의 결손보다 보다 큰 저온 민감성을 나타내었다 ($T_d=984$ min). 이러한 저온 민감성은 *E. coli*의 *csdA* 혹은 *srnB* 결손의 결과와 유사하며 리보솜 조립과 관련이 있는 생리적 기능으로 보인다.

참고문헌

- Ando, Y. and K. Nakamura. 2006. *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1606-1615.
- Carpousis, A.J., N.F. Vanzo, and L.C. Raynal. 1999. mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet.* 15, 24-28.
- Charollais, J., M. Dreyfus, and I. Iost. 2004. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* 32, 2751-2759.
- Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus, and I. Iost. 2003. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 48, 1253-1265.
- Cordin, O., J. Banroques, N.K. Tanner, and P. Linder. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.
- de la Cruz, J., D. Kressler, and P. Linder. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24, 192-198.
- Diges, C.M. and O.C. Uhlenbeck. 2001. *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J.* 20, 5503-5512.
- Fairman, M.E., P.A. Maroney, W. Wang, H.A. Bowers, P. Gollnick, T.W. Nilsen, and E. Jankowsky. 2004. Protein displacement by DEXH/D RNA helicases without duplex unwinding. *Science* 304, 730-734.
- Gorbalenya, A.E. and E.V. Koonin. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419-429.
- Hunger, K., C.L. Beckering, F. Wiegshoff, P.L. Graumann, and M.A. Marahiel. 2006. Cold-induced putative DEAD-box RNA helicase CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 240-248.
- Iost, I. and M. Dreyfus. 2006. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 34, 4189-4197.
- Karginov, F.V., J.M. Caruthers, Y. Hu, D.B. McKay, and O.C. Uhlenbeck. 2005. YxiN is a modular protein combining a DEX(D/H) core and a specific RNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 280, 35499-35505.
- Miczak, A., V.R. Kaberdin, C.L. Wei, and S. Lin-Chao. 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3865-3869.
- Perutka, J., W. Wang, D. Goerlitz, and A.M. Lambowitz. 2004. Use of computer designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DEXH/D-box protein DNA helicase genes. *J. Mol. Biol.* 336, 421-439.
- Py, B., C.F. Higgins, H.M. Krish, and A.J. Carpousis. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381, 169-172.
- Rocak, S. and P. Linder. 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 232-241.
- Sengoku, T., O. Nureki, A. Nakamura, S. Kobayashi, and S. Yokoyama. 2006. Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila Vasa*. *Cell* 125, 287-300.
- Tanner, N.K. and P. Linder. 2001. DEXD/H box RNA helicase: from genetic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* 8, 251-262.
- Tsu, C.A., K. Kossen, and O.C. Uhlenbeck. 2001. The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* 7, 702-709.
- Tsu, C.A. and O.C. Uhlenbeck. 1998. Kinetic analysis of the RNA-dependent adenosinetriphosphatase activity of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD protein specific for 23S ribosomal RNA. *Biochemistry* 37, 16989-16996.
- Wach, A. 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long-flanking homology regions for disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 8, 259-265.
- Wang, S., Y. Hu, M.T. Overgaard, F.V. Karginov, O.C. Uhlenbeck, and D.B. McKay. 2006. The domain of the *Bacillus subtilis* DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding of 23S rRNA has an RNA recognition motif fold. *RNA* 12, 959-967.