

DEAD-box RNA Helicase 유전자가 결핍된 *Bacillus subtilis*의 저온 충격 반응성과 저온 안정성 전사물

오은하 · 이상수*
배재대학교 생명공학과

Cold Shock Response and Low Temperature Stable Transcript of DEAD-box RNA Helicase in *Bacillus subtilis*

Eun Ha Oh and Sang Soo Lee*

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

(Received September 15, 2011 / Accepted November 11, 2011)

We investigated the cold shock sensitivity of DEAD-box RNA helicase gene deleted strains of in *Bacillus subtilis* CU1065. To understand cold shock effects, cells were cultivated at 37°C to log phase (O.D₆₀₀=0.5-0.6) and then temperature was shifted to 15°C. Cold shock slow down the growth rate of wild type and deleted strains of DEAD-box RNA helicase gene (*ydbR*, *yfmL*, *yqfR*, *dead*). The growth rate of *ydbR* deleted strain is 5 times severely reduced compared to that of wild type strain (CU1065). But the growth rate of other three (*yfmL*, *yqfR*, *dead*) deleted strains is nearly equal to the growth rate of wild type. Compared to 37°C, the amount of *ydbR* and *yqfR* mRNA transcripts are increased at the growth temperature of 15°C. On the other hands the mRNA transcripts of *yfmL* and *dead* are not changed at both conditions of 37°C and 15°C. Upon cold shock treatment *ydbR* mRNA transcript is clearly increased. After treatment of rifampicin (bacteria transcription inhibitor) the amount of *ydbR* mRNA was measured. Temperature shift from 37°C to 15°C and rifampicin treatment showed slowly decay of *ydbR* mRNA. But at 37°C and rifampicin treatment *ydbR* mRNA is rapidly reduced. These results showed that cold shock induction of *ydbR* mRNA resulted from the stability of *ydbR* mRNA and not from the transcription induction of *ydbR*. In relation to these results, we found the cold box element of *csp* (cold shock protein gene) in 5' untranslated region of *ydbR* gene. Cold shock induction of *ydbR* is caused by the stability of *ydbR* mRNA like the stability of *csp* mRNA.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cold shock, DEAD-box RNA helicase, rifampicin, RNA chaperone

살아있는 모든 생명체에게 온도는 매우 중요한 하나의 스트레스이다. 열 충격 스트레스는 박테리아로부터 인간에 이르기까지 매우 잘 연구되고 있다. 반면에 저온 충격 스트레스에 대한 연구의 관심은 비교적 최근에 시작되었다. 이렇게 늦게 연구가 시작된 것은 세포가 받는 손상이 열 충격에 비하여 저온 충격은 그 정도가 미미하기 때문이다. 저온 충격에 의한 박테리아가 입는 손상을 복구하는 과정은 세포막의 유동성 저하(20, 18), 단백질 합성 및 접힘의 감소(2, 9, 10) 등에서 일어난다. 단백질 합성의 감소는 DNA와 RNA의 안정화로 인한 mRNA의 전사 및 번역의 감소에 그 원인이 있다(10). 번역 개시는 낮은 온도에서 대장균이나 *Bacillus* 같은 박테리아의

생장에 영향을 미치는 주요 과정이다. 낮은 온도에서는 mRNA의 적절한 구조의 형성이 일어나지 않아 효과적인 번역의 개시가 감소되고 이로 인해 단백질 합성이 억제된다. 이와 관련하여 단백질 접힘 과정과 유사하게 단백질 대신 RNA에 작용하는 RNA chaperone이 제안되었고, 이는 RNA duplex를 불안정하게 하거나 단일사슬 핵산에 결합하여 RNA 분자의 misfolding을 억제하여 저온충격에 대응하게 된다(13). 저온 충격 조건에서 DEAD-box RNA helicase는 RNA duplex를 불안정하게 하며, 주요 저온 충격 단백질인 CSP와 상호 관련되어 작용하는 것으로 알려져 있다(6). CSP는 cold-shock domain을 가지며 주요 저온 충격 단백질의 대표적인 예로 알려져 있으며 박테리아를 비롯한 식물 동물 등의 대부분의 생명체에서 발견되었다(23, 24). Cold-shock domain은 RNA나

* For correspondence. E-mail: ssllee@pcu.ac.kr; Tel.: +82-42-520-5616; Fax: +82-70-4362-6306

Table 1. Oligonucleotide sequences used for LFH-PCR

oligo sequence
YfmL UpF 5'-CGGTGACATCTCGCTCTAAA-3'
YfmL Up-mls R 5'-GAGGGTTGCCAGAGTTAAAGGATCAGCCGGAAGCATTCCAATTC-3'
YfmL Dn-mls F 5'-CGATTATGTCTTTTGGCGAGTCGGCGTGCTGAGCCTGTGACAAA-3'
YfmL Dn R 5'-ACATTCCTGACGCGTTTCTC-3'
Mls F 5'-GATCCTTTAACTCTGGCAACCCTC-3'
Mls R 5'-GCCGACTGCGCAAAAAGACATAATCG-3'
YqfR Up F 5'-CCTCATTGGCCTCTGTCT-3'
YqfR Up-kana R 5'-CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGCAAGGCGATGTACTGCATCT-3'
YqfR Dn-kana F 5'-CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGAAGCCGAAGAAGGTTAAGCC-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'-GGGTAAGTACGCTCGCCGGTCCACGTGGTAAAGGCCCTCATGTTC-3'
DeaD Dn R 5'-CGATGAAACGGATCAGGCAA-3'
Cat-fwd 5'-CGGCAATAGTTACCCTTATTATCAAG-3'
Cat-rev 5'-CCAGCGTGGACCGGCGAGGCTAGTTACCC-3'
YdbR Up F 5'-GACAGAAAGCCTTGAAGGCT-3'
YdbR Up-spec R 5'-CGTTACGTTATTAGCGAGCCAGTCTGCTTCTTCAAATCCCATACG-3'
YdbR Dn-spec F 5'-CAATAAACCCCTTGCCTCGCTACGGGAAAAGCAACAACCGTTC-3'
YdbR Dn R 5'-CAGACATCATCGTCAGTCAC-3'
Seqc F 5'-GACTGGCTCGTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG-3'
Seqc R 5'-CGTAGCGCAAGGGTTTATTGTTTTCTAAAATCTG-3'

DNA에 결합하여 전사나 번역과정에 영향을 주는 것으로 보고되어있다(12). CSP의 저온충격 조건에서의 발현은 5' 부근의 UTR의 (untranslated region) cold box element가 관여하는 것으로 알려져 있으며, cold box element는 전사과정에서 유전자 발현 조절에 관여하기 보다는 전사물의 저온에서의 안정화를 통하여 저온에서 주로 발현되는 주요 저온 충격 단백질로 알려져 있다(7, 8).

*Bacillus subtilis*의 putative DEAD-box RNA helicase들은 *yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *deaD*의 4 종류의 유전자들이 있으며, 이들의 결손은 온도 민감성 성장을 보이며 RNA 분자의 misfolding을 억제하여 저온 충격에 대응하고 있는 것으로 알려져있다(15). 이들 DEAD-box RNA helicase들 중 *YdbR*과 *YqfR*은 저온에서 유도되는 단백질로 이들 두 유전자의 발현은 생장에 필수적으로 작용한다고 보고된 바 있다(11). 반면에 이들 두 유전자의 결손을 포함한 다른 DEAD-box RNA helicase 유전자들의 결손 돌연변이들이 제조되었고 저온에서는 민감하나 37°C에서의 생장은 야생형과 유사한 성장을 보여 비필수적인 유전자로 생각된다(15). 잘 연구된 대장균의 DEAD-box RNA helicase는 모두 5 종류로 (*DbpA*, *RhlB*, *SrmB*, *CsdA*, *RhlE*) 이들의 기능을 보면 *DbpA*는 리보솜 생합성(21), *RhlB*는 mRNA의 분해(3, 14, 16), *SrmB*와 *CsdA*는 리보솜 조립에 관여한다(17, 19). 또한 *SrmB*와 *CsdA*가 낮은 온도에서 잘 성장하지 않는 저온 민감성 성장을 보인다(4, 5). 반면에 *B. subtilis*에서의 기능은 잘 알려져 있지 않고 다만 *YdbR*의 RNA 결합 및 RNA helicase의 활성만이 보고되었다(1).

본 연구에서는 *B. subtilis*에 존재하는 DEAD-box RNA

helicase 유전자들의 기능과 관련하여 저온 충격에서 성장하는 정도를 측정하여 저온충격과 관련 있는 RNA helicase 유전자를 알아보고자 하였다. 또한 이들 유전자들의 저온에서의 발현 정도와 발현과정의 조절에 대하여 알아보기 위하여 저온 충격 조건에서 mRNA 양을 측정하였고, 전사과정 혹은 전사 후 과정에서 조절되는지를 알아보았다.

재료 및 방법

B. subtilis CU1065 (W168 *attSPβ trpC2*)를 사용하였으며 LB 배지에서 배양하여 형질전환에 사용하였다. 생장조건은 37°C에서 대수기까지 (O.D₆₀₀ = 0.5-0.6) 키우다가 15°C로 전환하여 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 여러 돌연변이 *B. subtilis* strains의 선별을 위해 사용한 항생제는 spectinomycin (100 µg/ml), kanamycin (10 µg/ml), erythromycin과 (1 µg/ml) lincomycin (25 µg/ml) (macrolide-lincosamide-streptogram B 저항성을 테스트), chloramphenicol (10 µg/ml) 이다. 돌연변이체의 제조를 위해 CU1065 유전체 DNA 정제는 이전에 사용한 방법을 사용하였다(15).

유전자 결손 돌연변이체의 제조

B. subtilis CU1065로 유전자 결손 돌연변이체를 제조하는 방법으로 Long-flanking homology (LFH) PCR을 이용하였다(22). CU1065 유전체 DNA를 주형으로 PCR하여 각각의 up-stream, down-stream, 항생제 저항성 cassette 부분의 DNA를 합성하였다(Table 1). 첫 번째 PCR에서 얻은 각 up-stream,

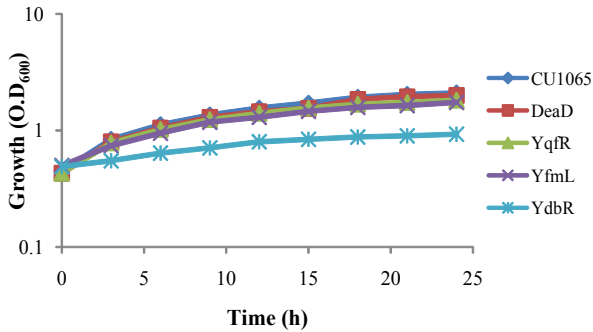


Fig. 1. Cold shock effect on growth of *B. subtilis* CU1065 (wt) and *deaD*⁻, *yqfR*⁻, *yfmL*⁻, *ydbR*⁻. Cells were grown in liquid LB media at 37°C to an O.D₆₀₀ of 0.5-0.6 and then immediately shifted to 15°C. At indicated time points, the O.D₆₀₀ of the cells was determined. The growth experiment was repeated three times.

cassette, down-stream의 비율은 1:2:1로 넣고 프라이머로는 up-stream F와 down-stream R을 사용하여 두 번째 PCR을 수행하였다. 이때 반응 조건은 94°C로 30초 동안 변성시키고, 55°C에서 30초 동안 annealing, 그리고 72°C 6분간 extension 하였다. PCR에서 얻은 DNA를 *B. subtilis* 형질전환에 사용하였다.

LB 배양액에서의 저온 충격 조건에서의 세포 성장 측정

하루 전에 LB 배양액으로 야생형 균주인 CU1065와 *ydbR*, *yqfR*, *yfmL*, *deaD* 유전자들의 결손 균주들을 키웠다. 250 ml 삼각플라스크에 LB 배양액을 30 ml 넣은 후 각각의 삼각플라스크에 같은 양의 세포로 접종하고 37°C 진탕 배양하여 O.D₆₀₀ = 0.5-0.6 정도로 키운 다음 15°C로 온도를 내려 저온 충격을 가하여 계속 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 저온 충격 조건에서의 생장은 세포의 O.D₆₀₀값을 측정하여 알아보았다.

RNA 분리 및 정량

하루 전에 진탕 배양한 CU1065를 다시 새로운 삼각 플라스크에 1:100으로 재접종하여 세포를 4,000×g에서 10분간 4°C에서 원심분리 하였다. 분리된 상층 액을 버리고 pellet에 lysis buffer을 500 μl 넣고 pellet을 풀어주고 lysozyme (5 μg/ml)을 10 μl 넣고 37°C incubator에 5분간 반응하였다. 10% SDS를 넣어 최종 농도를 1%로 하였고 70°C에서 5분간 가열 하였다. 액체 질소로 quick-freeze 하고, 얼은 시료는 1 M sodium acetate (pH 4.0)을 최종농도 0.2 M로 넣어주고 phenol을 동량으로 넣고 37°C에서 조심스럽게 녹이면서 섞어 준 후 9,800×g로 3분간 4°C에서 원심분리 하였다. RNA가 들어있는 상층액은 새로운 1.7 ml 튜브에 옮겼다. 다시 quick-freeze하고 최종농도 0.2 M sodium acetate (pH 4.0)가 되게 넣어주고 phenol을 동량 만큼 넣고 37°C에서 조심스럽게 녹이면서 섞어주었다. 다시 상층액은 새로운 튜브에 옮기고 phenol: chloroform (1:1)을 동량 넣어 섞은 후 9,800×g로 10분간 4°C로 원심분리 하였다. 상층액을 다시 새로운 튜브에

옮긴 후 상층액의 2.5배 부피의 100% ethanol 처리하여 -20°C에서 20분간 보관한 다음 9,800×g로 10분간 4°C에서 원심분리 한 후 다시 70% ethanol을 넣고 9,800×g로 10분간 4°C에서 원심분리 하였다. 그런 후 DEPC 처리된 삼차증류수로 녹인 후 -70°C에서 보관하였다.

멸균된 1.7 ml 튜브에 DEPC처리된 삼차 증류수를 사용하여 1:500으로 희석하였다. 삼차 증류수 998 μl+DEPC처리된 삼차 증류수 2 μl로 control을 잡이주었다. 분광 광도계를 사용하여 파장 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 정량하였다.

Northern blot 분석

동량의 RNA 샘플을(5 μg) 65°C에서 10분간 가열하여 RNA를 변성시킨 1% formaldehyde-agarose gel에 전기영동하여 분리하였다. 양전하를 띤 나일론 막에 (Hybond™ N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, USA) 이동시킨 후 자외선을 쬐어 cross-linking 하였다. Probe는 방사성 동위원소로 표지하기 위하여 random primer DNA labelling kit (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. Probe로 사용될 DNA를 100 ng이 되게 준비하여 random primer (9mer) 2 μl와 섞고 삼차 증류수를 이용하여 총 14 μl로 만든 후, DNA를 95°C에서 5분 동안 변성시켰다. 변성된 DNA 용액에 10×buffer와 dNTP를 각각 2.5 μl 섞은 후 여기에 5 μl의 α-P³² dCTP (Amersham Pharmacia Biotech)와 1 μl의 Exo-free Klenow fragment를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응 시켰다. 반응이 끝나면 95°C에서 5분 동안 변성시켜 얼음에 방치하였다. Hybridization signal의 정량은 BAS-1800 phospho-image analysis system (Fuji Film, Japan)을 사용하여 측정하였다.

결과

비교적 잘 연구되어 있는 대장균 DEAD-box RNA helicase 유전자와 상동성을 보이는 *B. subtilis*의 4 유전자들 (*yqfR*, *yfmL*, *ydbR*, *deaD*) 결손시킨 돌연변이체들을 사용하였고 (15), 이들의 저온충격 조건에서의 생장을 관찰하였다. 이들 돌연변이 균주들의 생장을 대수기까지 37°C에서 생장한 후 15°C로 낮추어 저온 충격을 주어 생장을 관찰하였다. *ydbR* 결손 돌연변이를 제외한 다른 결손 돌연변이들은 생장이 야생형 균주인 CU1065와 비슷한 성장곡선을 보였다. 다만 *ydbR* 결손 돌연변이는 그 성장 속도가 5 배 정도 현저히 느리게 진행되는 성장곡선을 보였다(Fig. 1). 이런 결과는 이전의 연구에서 *ydbR* 결손 돌연변이가 다소 저온에서 생장이 야생형 균주에 비해 다소 둔화되는 것과 상응하는 결과로 생각된다(15).

저온 조건에서 DEAD-box RNA helicase의 발현정도가 37°C에 비해 어떤 차이를 보이는지를 알아보기 위하여 Northern blot analysis를 하였다(Fig. 2). *YdbR*과 *yqfR*은 37°C에 비해 15°C에서 mRNA의 양이 뚜렷하게 증가되었고 이는 이들 두 유전자가 저온에서 유도된다는 보고(11)와 일치된 결과를 보였다. 반면에 *yfmL*과 *deaD*의 mRNA 양은 변화가 없어 저온

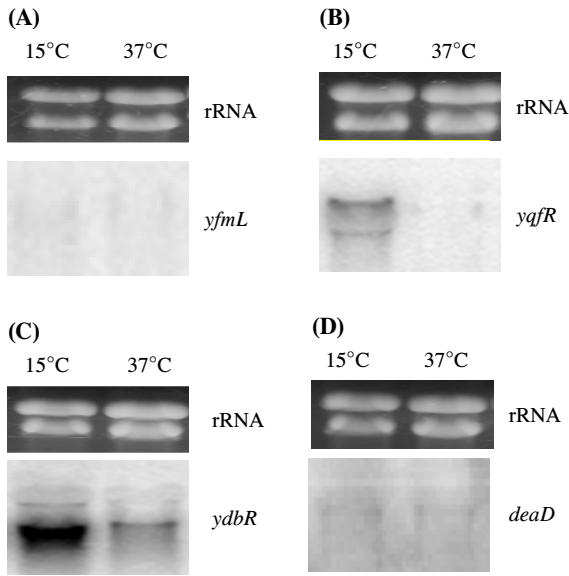


Fig. 2. Northern blot analysis showing the level of putative DEAD-box RNA helicase mRNA in CU1065 cells at 15 and 37°C. The upper panel shows the ethidium bromide-stained 16S and 23S rRNA gene bands from the same gel, which served as a loading control. The intensity of 16S rRNA was used to normalize the RNA helicase mRNA levels.

조건에서 유도되지 않는 결과를 보였다. 저온 충격을 가하였을 때 즉 37°C에서 15°C로 온도를 내리면서 mRNA의 양의 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 저온 충격을 가하였을 때 뚜렷한 mRNA의 증가를 보이는 것은 *ydbR*이었다. 반면에 *yqfR*은 37°C에 비해 15°C에서 거의 비슷한 mRNA 양을 유지하고 있었고, *yfmL*과 *deaD*는 변화 없이 매우 약한 mRNA 양을 보이고 있었다. 이는 저온 충격에 대응하는 RNA helicase가 *ydbR*이며 이 유전자의 결손이 저온에서 생장에 영향을 미치는 생장곡선과(Fig. 1) 부합하는 결과를 나타낸다.

저온 충격에서 *ydbR* mRNA 양이 증가되는 결과가 전사가 증가되는지 혹은 전사 후 전사물의 안정성이 증가되어 일어난 결과인지를 알아보기 위하여 저온충격 후 전사억제제인 rifampicin을 처리하여 mRNA 양의 증감을 Northern blot를 수행하여 알아보았다(Fig. 4). 37°C를 계속 유지하는 경우 rifampicin을 처리하면 *ydbR*의 mRNA 양이 급격히 감소하는 반면에($T_{1/2}=27$ min) 37°C에서 15°C로 온도를 낮추어 저온 충격을 가하면서 rifampicin을 처리하면 mRNA 양이 감소하는 속도가 매우 줄어들고 있음을 알 수 있다($T_{1/2}=213$ min). 이는 rifampicin을 처리하여 전사를 억제했음에도 불구하고 mRNA 양이 저온에서 유지하고 있는 것으로 보이며 저온에서 새로운 mRNA의 합성이 유도되기 보다는 합성된 mRNA의 안정성의 증가로 일어난 결과로 해석될 수 있다.

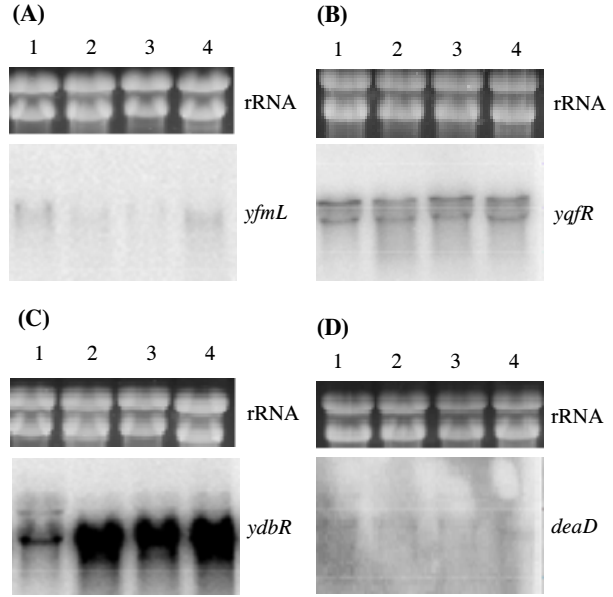


Fig. 3. Effects of cold shock on DEAD-box RNA helicase mRNA level. Northern blot analysis showing the level of putative DEAD-box RNA helicase in CU1065 cells just before 37°C (Lane 1) and at various time-points after shifting to 15°C (Lane 2, 3, 4; 1 h, 2 h, 3 h). The upper panel shows the ethidium bromide-stained 16S and 23S rRNA gene bands from the same gel, which served as a loading control. The intensity of 16S rRNA was used to normalize the RNA helicase mRNA levels.

고찰

저온 충격으로 RNA나 DNA의 이차 구조의 안정화로 전사, 번역, 복제의 효율이 감소한다. 이와 같은 효율의 감소를 복구하기 위한 세포의 대응으로 주요 저온 충격 단백질들이 발현되어 대처하게 된다. 이런 단백질들 중 대표적으로 RNA의 이차 구조에 영향을 주는 것으로는 RNA의 구조를 풀어헤치는 DEAD-box RNA helicase가 알려져 있다. 또한 이 helicase와 더불어 작용하는 것으로는 CSP가 (cold shock protein) 알려져 있다. 이들은 대부분 대장균의 연구를 통하여 그 기능이 파악되며 저온에서 발현되는 대장균의 DEAD-box RNA helicase는 SrmB와 CsdA로 ribosome assembly와 mRNA decay에 관여한다(4, 5). 하지만 이들 대장균의 DEAD-box RNA helicase들의 결손은 저온에서의 생장은 감소시키지만 왕성히 성장하는 대수기에서의 저온 충격은 큰 영향을 주지 못한다. 이에 비해 비교적 덜 연구된 *B. subtilis*의 putative DEAD-box RNA helicase는 4 종류로 그 효소학적 성질과 기능이 알려져 있지 않다. 최근에 Lee와 Oh에 의해 이들 helicase 유전자들의 결손에 의한 저온 민감성 생장이 알려졌다(15). 이 결과 *ydbR* 결손이 다소 저온 민감한 생장을 보이고 *yfmL*과 *yqfR* 결손은 약한 저온 민감성 생장을 나타내나 *deaD* 결손은 저온에 큰 영향을 보이지 않았다. 본 연구에서는 대수기까지 37°C에서 성장한 다음 15°C로 저온 충격을 가하여 생장을 관찰한

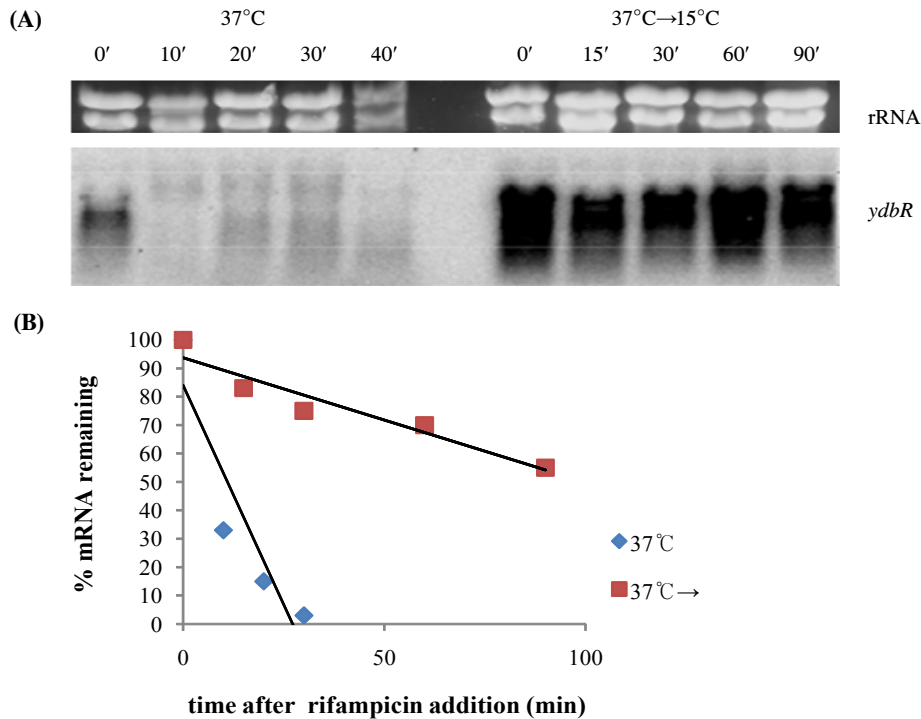


Fig. 4. Decay kinetics of the YdbR transcript at 37 and 15°C. (A) Northern blot showing the *ydbR* transcript decay in CU1065 cells at 20 min after cold shock treatment and continuous growing at 37°C. *YdbR* mRNA levels at various time-points (in minutes) are indicated above each lane after rifampicin addition. The upper panel shows the ethidium bromide-stained 16S and 23S rRNA gene bands from the same gel, which served as a loading control. The intensity of 16S rRNA was used to normalize the RNA helicase mRNA levels. (B) Plot of *ydbR* mRNA remaining (%) vs. time after rifampicin addition during cold shock. The value corresponding to 0 min after rifampicin addition is taken as 100%. Half lives determined from least squares fit for each data set.

결과 유일하게 *ydbR* 결손 균주의 생장이 느려지는 것을 관찰할 수 있었다(15). 반면에 다른 세 종류의 DEAD-box RNA helicase들 유전자의 결손 균주는 야생형 균주와 비슷한 생장을 보였다. 이는 저온에서 유도되는 DEAD-box RNA helicase 유전자가 *ydbR*과 *yqfR*으로 알려져 있고 이 중 저온 충격 조건에 주요하게 관여하는 것은 *ydbR*이라는 것임을 보여준다. 이들 유전자들의 저온에서의 발현 및 저온 충격 조건에서 발현되는 양상을 알아보기 위하여 Northern blot를 수행한 결과 *ydbR*과 *yqfR* 두 유전자의 mRNA가 37°C에 비해 15°C에서 증가하였다(Fig. 2). 37°C에서 대수기까지 성장하다가 15°C로 저온 충격을 가하면 *ydbR*이 뚜렷한 mRNA 양의 증가를 확인할 수 있어, 이 유전자의 결손이 저온 충격 조건에서의 성장 감소와 관련되어 있음을 알 수 있었다. 저온 충격 조건에서의 *ydbR* mRNA의 증가가 전사와 관련되어 있는지 혹은 저온에서의 안정성에 기인하는지는 전사를 저해하는 rifampicin 처리로 알 수 있었다(Fig. 4). Rifampicin 처리로 전사가 중단된 조건에서 37°C에서는 mRNA 감소가 급격히 일어나나($T_{1/2}$ =27 min), 반면에 15°C에서는 mRNA 양이 계속 유지되고 있음을 알 수 있었다($T_{1/2}$ =213 min). 이는 CSP의 저온에서의 mRNA 양의 증가가 UTR 부근의 cold box로 불리는 서열이 저온에서 mRNA 안정성을 가져온다는 보고와 같은 결과를

보인다(7, 8). 따라서 cold box로 불리는 DNA 서열을 DEAD-box RNA helicase 유전자 UTR에서 찾아본 결과 *ydbR*과 *yqfR*에서 cold box 유전자를 확인 할 수 있었다(Table 2).

11개 염기의 consensus cold box 서열과 비교하면 *ydbR*은 11개 염기 모두 일치하는 반면에 *yqfR*은 10개의 염기가 일치하였다. 또한 *B. subtilis*의 주요 CSP인 *csfB*와 비교하면 *ydbR*은 10개의 염기가 일치하는 반면에 *yqfR*은 8개가 일치하여 그 차이를 나타낸다. *B. subtilis*의 cold box 서열이 어떻게 mRNA의 안정성을 증가시키는데 대해 알려진 바가 없다. 또한 *ydbR*과 *yqfR*의 저온에서의 발현이 어떤 차이를 나타내는지 알 수 없고 이를 위한 연구가 계속 진행될 것이다.

적요

*Bacillus subtilis*에 존재하는 DEAD-box RNA helicase 유전자의 결손이 저온 충격에 민감성을 보이는지를 조사하였다. 저온 충격에 민감한지를 알아 보기 위하여 대수기에($O.D_{600}$ =0.5-0.6) 있는 세포를 15°C도 낮추어 저온충격을 가하여 생장하는 정도를 조사하였다. DEAD-box RNA helicase 유전자 *ydbR*, *yfmL*, *yqfR*, *deaD*의 결손 균주들이 저온충격을 가하였을 때 *ydbR* 결손 균주의 생장이 야생형 균주에 비해 5배 정도

Table 2. Comparison of the cold box elements in the 5' region of genes coding for cold-induced DEAD-box helicases and CSP

distance of cold-box totranscription start site (bp)	sequence	strains
8	T G A <u>A</u> G <u>A</u> A C A G A	<i>E. coli cspB</i>
7	T G A <u>C</u> G <u>T</u> A C A G A	<i>E. coli cspA</i>
48	T G A <u>C</u> G <u>T</u> A C A C A	<i>E. coli csdA</i>
80	T G A <u>A</u> A <u>A</u> A T A A A	<i>B. subtilis cspB</i>
nd*	T G A <u>A</u> T <u>A</u> A A C A	<i>B. subtilis yqfR</i>
nd*	T G A <u>A</u> A <u>A</u> A C A A A	<i>B. subtilis ydbR</i>
	<u>C</u> <u>T</u> T G A <u>A</u> N A A C A N A	consensus

* nd; Transcription start site was not determined.

현재까지 감소하였으나, 다른 DEAD-box RNA helicase 유전자의 (*yfmL*, *yqfR*, *deaD*) 결손은 야생형 균주와 비슷한 생장을 보였다. 저온에서의 유전자 발현을 알아보기 위하여 Northern blot으로 mRNA 양을 알아본 결과 37°C에 비해 15°C에서 *ydbR*과 *yqfR*의 mRNA 전사물 증가를 확인할 수 있었고, 반면에 *yfmL*과 *deaD*의 전사 증가는 관찰되지 않았다. 37°C에서 15°C로 저온 충격을 가하면 *ydbR* mRNA 양의 뚜렷한 증가를 확인하였고, 전사 억제제인 rifampicin를 처리하여 *ydbR* mRNA의 양을 조사하였을 때 15°C 조건에서는 mRNA 양이 거의 유지하는 반면에 37°C 조건에서는 급격한 mRNA의 감소가 일어나 전사과정에서 유도되기 보다는 전사 후 전사물의 안정성에 기인하는 것으로 보인다. 이와 관련하여 *ydbR* 유전자의 5' UTR (untranslated region) 부근에서 *csp* (cold shock protein) 유전자에서 관찰되는 cold box element를 확인하였고, *ydbR*이 저온 충격 조건에서 발현되는 과정이 *csp*와 유사하게 전사물의 안정성에 기인함을 알 수 있었다.

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.
- Broeze, R.J., C.J. Solomon, and D.H. Pope. 1978. Effects of low temperature on *in vivo* and *in vitro* protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 134, 861-874.
- 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.
- El-Sharoud, W.M. and P.L. Graumann. 2006. Cold shock proteins aid coupling of transcription and translation in bacteria. *Sci. Prog.* 90, 15-27.
- Fang, L., W. Jiang, W. Bae, and M. Inouye. 1997. Promoter-independent cold shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* 23, 355-364.
- Fang, L., Y. Hou, and M. Inouye. 1988. Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transcript expression at low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 90-95.
- Friedman, H., P. Lu, and A. Rich. 1971. Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 61, 105-121.
- Hall, M.N., J. Gabay, M. Debarbouille, and M. Schwarz. 1982. A role for messenger-RNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* 295, 616-618.
- 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.
- Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye. 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272, 196-202.
- Lorsch, J.R. 2002. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* 109, 797-800.
- Miczak, A., V.R. Kabardin, 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.
- Oh, E.H. and S.S. Lee. 2010. Cold sensitive growth of deletion mutants of DEAD-box RNA helicase genes in *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Microbiol.* 46, 233-239.
- 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.
- Sakamoto, T. and D.A. Bryant. 1997. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Mol. Microbiol.* 23, 1281-1292.
- 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.
- Thieringer, H.A., P.G. Jones, and M. Inouye. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioassays* 20, 49-57.
- Tsu, C. 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.
- Wistow, G. 1990. Cold shock and DNA binding. *Nature* 344, 823-824.
- Wolffe, A.P., S. Tafuri, M. Ranjan, and M. Familari. 1992. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol.* 4, 290-298.