

Non-ribosomal Ribosome Assembly Factors in *Escherichia coli*

Eunsil Choi and Jihwan Hwang*

Department of Integrative Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received July 23, 2014 / Revised August 13, 2014 / Accepted August 19, 2014

The ribosome is a protein synthesizing machinery and a ribonucleoprotein complex that consists of three ribosomal RNAs (23S, 16S and 5S) and 54 ribosomal proteins in bacteria. In the course of ribosome assembly, ribosomal proteins (r-protein) and rRNAs are modified, the r-proteins bind to rRNAs to form ribonucleoprotein complexes which are folded into mature ribosomal subunits. In this process, a number of non-ribosomal *trans*-acting factors organize the assembly process of the components. Those factors include GTP- and ATP-binding proteins, rRNA and r-protein modification enzymes, chaperones, and RNA helicases. During ribosome biogenesis, they participate in the modifications of ribosomal proteins and RNAs, and the assemblies of ribosomal proteins with rRNAs. Ribosomes can be assembled from a discrete set of components *in vitro* and it is notable that *in vivo* ribosome assembly is much faster than *in vitro* ribosome assembly. This suggests that non-ribosomal ribosome assembly factors help to overcome several kinetic traps in ribosome biogenesis process. In spite of accumulation of genetic, structural, and biochemical data, not only the entire procedure of bacterial ribosome synthesis but also most of roles of ribosome assembly factors remain elusive. Here, we review ribosome assembly factors involved in the ribosome maturation of *Escherichia coli*, and summarize the contributions of several ribosome assembly factors which associate with 50S and 30S ribosomal subunits, respectively.

Key words : *Escherichia coli*, GTPase, helicase, ribosome, rRNA

서 론

리보솜은 리보솜 단백질(ribosomal protein)들과 리보솜 RNA (ribosomal RNA; rRNA)들로 이루어진 리보핵산단백질 복합체로, 전령 RNA (messenger RNA; mRNA)상의 정보를 단백질로 번역하는 단계에 중심적인 역할을 한다. 원핵세포의 리보솜은 70S 입자로 이루어져 있으며, 이는 30S 리보솜 소단위체 (small ribosomal subunit)와 50S 리보솜 소단위체 (large ribosomal subunit)로 구성되어 있다. 30S 리보솜 소단위체는 16S rRNA (1,542 nt)와 21개의 리보솜 단백질로 이루어져 있으며, 번역과정에서 mRNA와 결합하여 mRNA상의 유전정보를 해독하는 기능을 가진다. 50S 리보솜 소단위체의 경우 23S rRNA (2,904 nt), 5S rRNA (120 nt)와 33개의 리보솜 단백질로 이루어져 있다. 50S 리보솜 소단위체 내부에는 peptidyl transferase center (PTC)가 존재하여, 아미노산간의 펩티드결합이 일어나도록 한다.

리보솜은 전체의 2/3가 RNA로 구성되어 있고 1/3만이 단

백질로 이루어져 있다[92]. 70S 리보솜의 결정구조를 관찰해보면, PTC에서 촉매부위는 리보솜 단백질이 아닌 rRNA에 위치한다는 것이 보고되어 있다[82]. 이는 리보솜이 사실상 리보자임(ribozyme)에 속하며, 리보솜의 기능에 있어서 RNA가 중심적인 역할을 한다는 것을 나타낸다.

리보솜 조립 과정 중에는 RNA의 구조변화와 다양한 단백질들의 결합들이 연속적으로 일어나며, 리보솜 단백질과의 결합으로 rRNA의 구조가 안정화된다[45, 109]. 이러한 리보솜 조립의 과정은 다음의 단계들로 나눌 수 있다. (a) rRNA의 전사(transcription), 가공(processing), 수식(modification); (b) 리보솜 단백질의 번역과 수식; (c) rRNA와 리보솜 단백질의 적절한 접합; (d) 리보솜 단백질들의 결합; (e) 조립인자(assembly factor)들의 결합과 방출. 이러한 단계들을 도와주는 조립인자들로서 GTPase, DEAD-Box helicase, rRNA modification enzyme, chaperone 등 다양한 단백질들이 존재한다. 리보솜 조립단계에 다양한 조립인자들이 관여한다는 것이 밝혀졌지만, 아직까지 이들이 분자적 수준에서 리보솜 조립과정에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

이 총설에서는 기존연구를 토대로 50S와 30S 리보솜 소단위체의 조립인자들에 대한 분류, 이들의 결실 또는 발현 정도의 감소가 리보솜 조립에 미치는 영향, 조립인자가 작용하는 공간적, 시간적 순서에 대해 알아보려고 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2194, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : hwangjh@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ribosome assembly factors

리보솜 조립은 생체 내(*in vivo*)에서 뿐만 아니라 시험관 내(*in vitro*)에서도 가능하다. *In vitro*에서 분리·정제된 rRNA와 리보솜 단백질들로부터 50S 그리고 30S 리보솜 소단위체들은 리보솜 조립인자들의 도움 없이 자발적으로 만들어질 수 있으며 기능도 가진다[79, 104]. 또한, 시험관 내 전사(*in vitro* transcription)를 통해 만들어진 수식되지 않은 rRNA와 리보솜 단백질들로부터 *in vitro*상에서 50S 그리고 30S 리보솜 소단위체가 합성될 수 있다[34, 59, 64]. 이는 리보솜 조립에 필요한 모든 정보가 rRNA와 리보솜 단백질에 존재한다는 것을 의미하며, 특히 수식되지 않은 rRNA로도 조립이 가능하다는 것은 조립 과정에서 rRNA 구성요소 그 자체가 중요하다는 것을 의미한다. 하지만 세포 내에서 리보솜 조립은 GTPase, DEAD-Box helicase, rRNA modification enzyme, chaperone 등 다양한 효소들의 도움을 받아 이루어진다. 그렇다면 리보솜 조립에 관여하는 수많은 효소들은 리보솜 조립과정에 각각 어떠한 역할을 하는 것일까?

*In vitro*에서 rRNA와 리보솜 단백질로부터 리보솜 조립이 가능하나, *in vivo*에서 이루어지는 것보다 그 속도가 느린 것이 알려져 있다[67]. *In vitro*에서 30S 리보솜 소단위체를 재구성하는 실험에서, 보조인자로서 Era, RimM, RimP와 같은 조립인자들을 넣어주었을 때, rRNA에 리보솜 단백질들이 결합하는 속도가 훨씬 빨라지는 것을 관찰 할 수 있었다[11]. 이러한

결과를 보면, 여러 조립인자들이 리보솜 조립 과정에서 kinetic trap들을 극복하게 하고, 조립 속도를 더 빠르게 촉매하고 있다는 것을 알 수 있다[110].

50S ribosomal subunit assembly factors

50S 리보솜 소단위체 조립은 5S, 23S rRNA 전구체에 33개의 리보솜단백질들이 차례로 결합하면서 진행된다. 야생형 세포 내에서 조립과정의 중간산물은 관찰되지 않으나, 온도감수성 돌연변이체, 조건 돌연변이체(conditional mutant)에서는 중간산물들을 관찰 할 수 있었고[37, 38, 66, 70], 이 연구결과로부터 조립과정의 순서를 예측할 수 있었다. 지금까지 세포 내에서 50S 리보솜 소단위체 조립 과정 중 관찰된 중간산물은 3가지이다. 먼저 16개의 리보솜 단백질과 5S, 23S rRNA 전구체로 이루어진 32S particle이 존재하며, 32S particle에 8개의 리보솜 단백질이 더 결합된 43S particle이 있다. 마지막으로 43S particle에 6개의 리보솜 단백질이 결합되어 리보솜 단백질은 다 갖추었으나 rRNA 가공이 이루어지지 않은 50S particle이 존재하는 것이 밝혀졌다[42, 67, 68, 77].

이러한 50S 리보솜 소단위체의 조립에는 GTPase에 속하는 ObgE, Der, HflX뿐만 아니라 RNA helicase에 속하는 DbpA, CsdA, SrmB, RhlE와 rRNA 메틸전이효소인 RrmJ, 그리고 샤페론인 GroEL등이 조립인자로서 관여한다(Table. 1). 이러한 조립인자들의 역할을 알기 위해서는 리보솜상의 결합부위를

Table 1. Non-ribosomal assembly factors in *Escherichia coli*

Subunit	Class	Protein	Binding partner	
50S	GTPase	ObgE	50S and 30S subunit 16S and 23S rRNA L2, L4, L12, L16, L17, S3, S4, S5, S13, S16	
		Der	50S subunit YihI	
		HflX	30S and 50S subunit, 70S ribosome 16S and 23S rRNA	
	GAP	YihI	Der	
		DbpA	Helix92 in PTC in 23S rRNA	
	Helicase	CsdA	50S precursor (40S particle)	
		SrmB	50S precursor (40S particle) 23S rRNA (domain I), L4, L24	
		RhlE	30S subunit, 40S particle, 70S ribosome,	
		rRNA methyltransferase	RrmJ	50S subunit
		Chaperone	GroEL	S2, L9, L7/L12
30S	GTPase	Era	30S subunit, 16S rRNA	
		RsgA	30S subunit	
	rRNA methyltransferase	KsgA	30S subunit	
		RbfA	30S subunit	
		RimJ	Pre-30S subunit, 16S rRNA	
	Ribosome maturation factor	RimM	30S subunit S19	
		RimP	30S subunit	
		Chaperone	DnaK	S4, S12, S17, S21, S3, S5, S8, S16, S19

아는 것이 중요하다. 50S 리보솜 소단위체와 이의 조립인자가 결합한 복합체의 결정구조는 ObgE의 경우가 유일하나, 여러 실험결과들을 통해 이들의 결합부위를 예측할 수 있다. 이들의 결합부위를 살펴보면 크게 3부분으로 밀집되어있는 것을 볼 수 있다. 먼저 PTC에 Der, ObgE, RrmJ 그리고 DbpA가 결합할 것으로 추정된다. DbpA의 경우, PTC근처에 위치한 helix92와 강하게 결합하는 것으로 알려져 있다[26]. 나머지 세 단백질들은 실험결과들로부터 그 결합부위를 예측할 수 있었는데, RrmJ의 경우 기질로 이용되는 U2552가 PTC에 위치하고 있기 때문에 PTC에 결합할 것이라고 추측된다[15]. 그리고 Der, ObgE는 *rrmJ*-deletion mutant의 억제자이기 때문에 RrmJ결합부위와 가까운 위치에 결합할 것이라 생각된다. 실제로 ObgE는 PTC와 L12에 결합하는 것이 cryo-EM으로 최근에 확인되었다[31]. 두 번째는 SrmB, CsdA, RhlE가 결합할 것

이라 추정되는 L24 부분이다. 이 세 단백질들 중 실제로 L24와의 결합이 관찰된 것은 SrmB이다[105]. CsdA는 *srmb*-deletion strain의 유전적으로 억제자로서 얻어져서 그 기능이 밝혀졌고[18], *csdA*-deletion strain의 유전학적 억제자 연구로 얻은 단백질이 RhlE이다[54]. 따라서 이러한 연관성을 토대로 이들이 SrmB가 결합하는 L24 근처에 결합할 것이라는 것을 추측할 수 있었다. 이 외에도 GroEL이 L7/L12 stalk 부위에 결합할 것으로 추측된다.

리보솜 조립 과정에서 각 조립인자들의 정확한 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 각 조립인자들의 돌연변이체들의 50S 리보솜 소단위체 전구체의 rRNA와 리보솜 단백질 조성의 분석을 통해(Table 2), 리보솜 조립과정 중 어느 단계에 관여하는지 예상할 수 있다. 또한 억제자 선별, yeast two-hybrid 등의 실험을 통해 조립인자들간 또는 조립인자와 리보솜

Table 2. Characteristics of ribosome particles upon depletion or mutation of ribosome assembly factors

Protein	Precursor	Disappeared r-proteins	Decreased r-proteins
ObgE	40S	L33, L34, L16	
Der	45S, 32S, 21S	L9, L18	L2, L6
YihI*	Immature 50S subunit	L9, L18, L25	
DbpA	45S	L16, L25, L27, L28, L33, L34, L35	L20, L29, L30
CsdA	40S		L6, L16, L25, L28, L32, L33, L34
SrmB	40S	L13, L28, L34, L35, L36	L6, L7/L12, L14, L16, L25, L27, L31, L32, L33
RhlE	40S		
RrmJ	40S	L5, L16, L18, L25, L27, L28, L30	
GroEL	45S		
RimM	Immature 30S subunit	S10, S14, S13, S19	
DnaK	45S, 32S, 21S	L2, L6, L9, L16, L25, L27, L28, L30, L32, S3, S10, S14, S21	S1, S2, S5

* : overexpression

Table 3. Genetic interactions between non-ribosome assembly factors

Genotype	Suppressed by
$\Delta rrmJ$	Overexpression of ObgE
L24 (G84D, ts)	Overexpression of Der
$\Delta srmb$	Overexpression of SrmB
$\Delta csdA$	Overexpression of CsdA
$\Delta dnaK / \Delta dnaJ$	Overexpression of RhlE
Era (E200K, cs)	Overexpression of GroEL
$\Delta rsgA$	Overexpression of KsgA
$\Delta rsgA$	Overexpression of mutant of RbfA
$\Delta rbfA$	Overexpression of Era
S5 (G28D)	Overexpression of RbfA
$\Delta rimM$	Overexpression of Era
$\Delta rimM$	Overexpression of RimJ
RimM (Y106A,Y107A)	Overexpression of RbfA
	Mutations of either S13(S13 Δ 89-99) or S19(S19H83Y)
	Mutation of either S13(S13 Δ 89-99) or S19(S19H83Y)
	Mutation of rRNA helix 31, 33b
DnaK [base substitutions (A for G) at three nucleotide positions, 95, 1364, and 1403-ts]	Overexpression of S4

단백질들간의 관계도 알 수 있다(Table 3). 이러한 결과들을 통해 조립인자들의 역할과 시공간적 참여단계를 알 수 있다.

ObgE

ObgE는 50S 리보솜 소단위체의 조립에 관여하지만, pull-down assay를 통해 50S 리보솜 소단위체의 단백질(L2, L4, L16, L17)뿐만 아니라 30S 리보솜 소단위체의 단백질(S3, S4, S5, S13, S16)과도 결합한다는 것이 밝혀졌다[90]. 최근 50S 리보솜 소단위체 조립인자 중 유일하게 ObgE의 50S 리보솜상의 결합부위가 cryo-EM에 의해 밝혀졌는데, 50S 리보솜 소단위체의 PTC와 L12에 결합한다고 보고되었다[31].

*obgE*에 온도감수성 돌연변이(S314P)가 일어나면 23S rRNA의 5' 말단 뿐만 아니라 3' 말단의 가공이 일어나지 않아 pre-23S rRNA가 축적되고, 16S rRNA의 가공도 이루어지지 않아 전구체인 17S rRNA가 축적된다[90]. 또한 70S와 폴리솜(polysome)이 감소하고 30S와 50S 리보솜 소단위체가 비정상적으로 축적되며, 이때 축적된 50S particle에는 L33, L34, L16이 결합된 상태이다[90]. 이를 통해 ObgE는 50S 리보솜 소단위체 조립과정에서 리보솜 단백질들을 효과적으로 채용하는데 필요하다는 것을 알 수 있다.

흥미롭게도 ObgE의 과발현은 *rrmJ* 결실에 의한 성장저해 효과를 완화할 수 있었다[100]. RrmJ는 rRNA를 메틸화 시킴으로써 50S 리보솜 소단위체 조립의 후반 과정에 관여한다고 알려져 있다[9, 15, 40]. *rrmJ*-deletion strain은 느린 성장속도를 나타내며, 비정상적인 리보솜 프로파일(ribosome profile)을 보인다[9, 15]. *rrmJ*-deletion strain의 표현형을 야생형의 표현형으로 회복시키는 ObgE의 능력은 ObgE가 RrmJ와 같이 50S 리보솜 소단위체 조립의 후반부 과정에 관여한다는 것을 말해준다.

Der

Der은 GTP 의존적으로 50S에 결합하여 그 조립을 돕는 GTPase로, GTP 존재 하에서 50S와 결합한다[2, 48]. Der은 다른 GTPase들과 구별되는 특징적인 구조를 가지고 있는데, N 말단에 2개의 GTP-binding domain, C 말단에 RNA-binding domain인 KH-domain을 가진다[49]. 두 개의 GTP-binding domain 각각에 점 돌연변이를 도입시켜 두 도메인의 역할을 알아본 실험에서, 두 번째 G-domain은 리보솜과의 결합에 관여하며, 첫 번째 것은 Der과 리보솜간의 약한 결합을 안정화시켜 준다는 것이 밝혀졌다[103].

세포 내에서 Der이 감소할 경우, ObgE의 경우와 유사하게 polysome과 monosome이 감소하고, 30S, 50S 리보솜 소단위체의 양이 증가하는 것을 볼 수 있었다[48]. 70S가 두 개의 소단위체로 분리되는 낮은 Mg^{2+} 농도 조건에서는, 50S 리보솜 소단위체가 감소함과 동시에 50S 전구체가 축적되는 것을 볼

수 있다[48]. 이러한 50S 전구체와 정상적인 50S 소단위체의 리보솜 단백질 조성을 비교해보면, L9과 L18이 결여되어있고 L2와 L6이 줄어들어있다[48]. 따라서, Der은 직접적 또는 간접적으로 이 리보솜 단백질들의 결합을 돕거나 강화시킨다고 예상되고 있다. 또한 세포 내에서 Der이 감소할 경우, 16S rRNA의 전구체가 17S rRNA의 형태로 관찰되며, 23S rRNA 전구체는 5' 말단에 7개의 base가 더 결합하여있고, 3' 말단도 가공되지 않은 상태이다[48].

ObgE의 경우와 같이 Der의 과발현은 *rrmJ*-deletion strain의 성장, 리보솜 조립과정에 있어서 관찰되는 결함들을 억제할 수 있다[100]. 성장저해뿐만 아니라 30S와 50S가 축적되어 있었던 리보솜 프로파일도 야생형과 같이 회복시켜준다. 이로 부터 Der이 RrmJ, ObgE와 같이 50S 리보솜 소단위체 조립 후반부 과정에 관여함을 알 수 있다.

YihI

YihI는 Der에 1:1로 결합하여, Der의 GTPase 활성을 활성화시켜주는 Der의 GAP (GTPase-activating protein)으로 기능한다[47].

YihI가 과발현 될 경우, GTP 결합상태의 Der은 YihI에 의해 GTP 가수분해가 촉진되어 50S 리보솜 소단위체와의 결합이 저해된다[47]. 그 결과, 리보솜 조립이 제대로 이루어지지 않아 세포 내에는 16S rRNA와 23S rRNA, 그리고 50S 전구체가 축적된다. 이러한 전구체에는 L9, L18, L25가 결여되어있으며, 이러한 표현형은 Der-depleted strain과 일치한다[47]. 또한 YihI 과발현에 의해 일어나는 이러한 효과는 Der 과발현에 의해 상쇄된다[47]. 즉, YihI는 Der이 리보솜에 결합하는 것을 막음으로써 Der의 기능을 조절하는 Der 조절자이다.

HflX

HflX는 GTPase 활성뿐만 아니라, 동시에 ATPase 활성도 나타내는 독특한 단백질이다[96]. GTPase domain은 잘 보존된 4개의 모티프들(G1-G4)로 이루어져있으며, 이들은 GTP와의 결합과 GTP의 분해에 관여하는데[6], 이 중 G4 (NKXD)의 aspartate는 guanine 뉴클레오티드에 대한 특이성을 제공한다[111]. ATPase 활성을 보이는 또 다른 GTPase인 YchF의 경우, G4 motif가 NVNE로 전형적인 G4 motif와 달라 GTP보다 ATP에 더 잘 결합한다[62]. 그러나 HflX는 전형적인 G4 motif (NKID)를 가짐에도 불구하고, 특이하게도 GTP뿐만 아니라 ATP도 분해 가능하다. ATP와 결합하여 ATPase 활성을 나타내나, ATP보다는 GTP를 더 선호한다[27, 53, 96].

HflX는 뉴클레오티드 결합상태에 상관없이 30S, 50S 리보솜 소단위체, 그리고 70S 리보솜에 비특이적인 결합이 가능하나, 23S, 16S rRNA와의 결합은 뉴클레오티드가 있을 때에만 이루어진다[3, 32, 53]. 하지만, *E. coli*를 비롯한 다른 bacteria에서 *hflX*-deletion strain은 특별한 리보솜 결합이 나타나지 않

아, 앞으로 이에 대한 연구가 더 필요하다[27, 30, 75].

DbpA

DbpA (DEAD-box protein A)는 50S 리보솜 소단위체의 조립에 관여하는 ATP-dependent DEAD-box helicase이다. DbpA는 RNA recognition motif (RRM)과 유사한 C 말단 영역을 이용하여 23S rRNA의 PTC에 위치한 helix92에 특이적으로 강한 결합을 한다[57, 63, 76, 106, 108]. 이러한 결합은 DbpA를 활성화시켜 ATPase와 helicase 활성을 촉진시킨다[76, 106]. DbpA의 N 말단에는 2개의 RecA-like domain이 있으며, 이들은 RNA에 약하게 비특이적으로 결합하여 ATP-binding pocket을 형성한다[57]. 특이적으로 23S rRNA 존재 하에서 DbpA는 helix92와 강하게 결합하고, rRNA와 RecA-like domain들이 접하게 되면서 ATPase 활성이 높아진다[4, 106].

dbp4-deletion strain은 성장결함을 나타내지 않으나[85], 활성부위에 점 돌연변이가 일어난 DbpA (R331A)를 야생형균주에서 과발현 시키면 성장속도가 매우 느려질 뿐만 아니라 리보솜 조립도 제대로 일어나지 못한다[29]. 30S, 50S 리보솜 소단위체의 양은 증가하는 반면 70S의 양은 감소하는 것을 볼 수 있었으며, 증가된 50S 리보솜 소단위체들은 실제로 50S 전구체(45S particle)로 밝혀졌다[29]. 뿐만 아니라 rRNA 가공 또한 제대로 일어나지 않아 미성숙한 23S, 17S rRNA가 축적된다[95]. 관찰된 45S particle의 리보솜 단백질 조성을 살펴보면 L16, L25, L27, L28, L33, L34, L35의 양이 현저하게 줄어들었고, L20, L29, L30의 양이 조금 감소되어 있었다[95]. 이 중 L16는 리보솜 조립 과정 중 후반에 결합되는 단백질로서, DbpA가 리보솜 조립과정 중 후반 과정에 관여한다는 것을 알 수 있다. L16는 23S rRNA의 helix82에 결합하는데, 이는 PTC 그리고 DbpA가 결합하는 자리와 가까운 위치이다[58, 87]. L16의 결합은 50S 전구체에 굉장히 큰 구조적 변화를 일으켜 50S 리보솜 소단위체의 고유구조에 가까워지도록 하므로 L16를 molecular glue라고 한다[81]. 아직 자세한 기작이 밝혀지지는 않았지만, 위의 결과들로부터 DbpA가 23S rRNA에 L16이 결합하는 것을 용이하게 함으로써 리보솜 조립과정에 관여할 것이라고 추측되고 있다[95].

CsdA

CsdA는 dead-box RNA helicase로서 리보솜 조립, RNA 분해, 번역 등 다양한 세포 내 과정에 관여하고[18, 74, 88], cold-shock에 의해 발현이 유도되는 cold-shock RNA helicase이다[56].

CsdA는 50S 전구체인 40S particle과 직접 결합한다[18]. 뿐만 아니라 CsdA는 *srnB*-deletion strain에서 축적되는 40S particle과도 결합하는 것으로 보아, 리보솜 조립 과정에서 SrmB가 관여한 후에 CsdA의 작용이 이루어진다는 것을 짐작

할 수 있다[18]. 위의 40S particle은 저온에서 성장하는 *csdA*-deletion strain에서 축적되고 이로 인해 성장속도가 느려진다[18, 56].

csdA-deletion strain에서 관찰된 40S particle의 리보솜 단백질 조성을 분석한 결과, L6, L16, L25, L28, L32, L33, L34의 양이 줄어들었으며, 23S rRNA 5' 말단에 7개의 뉴클레오티드가 더 존재하는 23S rRNA 전구체를 포함하고 있었다[18]. 이들은 대부분 리보솜 조립 후반과정에 결합하는 단백질들이며, 이는 CsdA가 리보솜 조립 후반 과정에 관여함을 알 수 있다.

csdA-deletion strain의 저온에서의 느린 성장속도는 리보솜 조립인자 RhlE의 유전자의 돌연변이에 의해 억제된다[54]. 따라서 RhlE와 유사한 단계에서 작용한다는 것을 알 수 있다.

SrmB

SrmB는 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 23S rRNA의 5' 말단부분, 그리고 L4, L24와 결합함으로써 리보솜단백질 복합체를 형성하여 50S 리보솜 소단위체의 조립에 관여하는 DEAD-box RNA helicase이다[105]. 뿐만 아니라 SrmB의 과발현은 리보솜 단백질 L24의 온도감수성 돌연변이를 억제한다는 결과로부터 SrmB가 직접적으로 리보솜 조립에 관여한다는 것을 알 수 있었다[80].

srnB-deletion strain은 *csdA* 그리고 *rhlE* 돌연변이체 경우와 같이 저온에서 잘 자라지 못하며[54], 50S 리보솜 소단위체의 양이 줄며, 40S particles이 축적되어 있다[17]. 이렇게 축적된 40S particle의 단백질 조성 분석 결과, 5개의 단백질(L13, L28, L34, L35, L36)이 존재하지 않았고, 9개의 단백질(L6, L7/12, L14, L16, L25, L27, L31, L32, L33)은 그 양이 감소하였다[17]. 이 중 L13은 *in vitro*상에서의 50S 리보솜 소단위체 조립과정 중 초기 중간체의 형성에 필수적인데[98], 이를 통해 SrmB가 50S 리보솜 소단위체 조립의 초기과정에 관여한다는 것을 알 수 있다[17].

RhlE

RhlE는 40S particle에 결합하여 50S 리보솜 소단위체 조립에 관여하는 RNA helicase이다[54]. 50S 리보솜 소단위체 조립을 돕는 DEAD-box RNA helicase 중 하나인 *csdA*가 결실되면 세포는 저온에서 잘 자라지 못하는데, 이러한 돌연변이의 multicopy suppressor를 찾는 과정 중 *rhlE*가 선별되었다[52, 54].

RhlE는 CsdA뿐만 아니라 SrmB와도 기능적으로 연관되어 있다. *srnB*- 또는 *csdA*- deletion strain에 추가적으로 *rhlE*를 결실시키면 single deletion strain보다 성장결함이 더욱 심화되며, 미성숙한 23S rRNA 그리고 40S particle도 더 많이 축적된다[54]. 따라서 RhlE는 리보솜 조립 과정에서 리보솜과 결합한 상태로 DeaD와 SrmB를 조절하는 역할을 할 것으로 추측된다[54].

RrmJ

RrmJ는 고온유도(heat-inducible) 2'-O-methyltransferase로, 23S rRNA의 U2552에 메틸화를 일으키며, 이러한 수식은 잘 보존되어 있다[9, 15]. 23S rRNA를 수식하는 다른 메틸화효소(methylase)들과 달리, *rrmJ*의 결실은 생장과 리보솜 조립에 영향을 준다. *rrmJ*-deletion strain에서는 rRNA 메틸화의 부재로 인해 50S 그리고 30S 리보솜 소단위체가 증가하고 70S 리보솜 형성이 감소한다[9,15,40]. *rrmJ*-deletion strain에서 관찰된 40S particle에는 7개의 리보솜 단백질들(L5, L16, L18, L25, L27, L28, L30)의 양이 현저히 감소한 것을 볼 수 있는데, 이 모두는 late assembly proteins group에 속한다[40, 78]. 또한 RrmJ는 naked 23S rRNA는 메틸화시키지 못하며, 리보솜 단백질들이 결합된 50S 전구체상의 23S rRNA만 메틸화시키는데[9], 이러한 결과들은 RrmJ가 리보솜 조립 후반과정에 관여한다는 것을 알려준다.

GroEL

GroEL은 열충격(heat-shock)에 의해 유도되는 샤페론으로, 리보솜 단백질 S2, L9, L7/L12와 상호작용한다[46]. 고온조건에서 GroEL은 RNaseE 의존적인 5S rRNA 가공 과정에 관여함으로써 50S 리보솜 소단위체 조립 후반 과정에 관여한다[28, 97]. DnaK도 GroEL과 마찬가지로 고온조건에서 리보솜 조립에 관여하는 샤페론이며, GroEL의 과발현은 44°C에서 DnaK가 없을 때 발생하는 리보솜 조립과정의 결함을 보완할 수 있다[28]. 이는 GroEL이 DnaK와 마찬가지로 리보솜 조립과정에 관여한다는 것을 말해준다.

온도감수성 *groEL* mutant는 44°C에서 70S 리보솜의 양은 줄어들고, 50S 리보솜 소단위체의 전구체인 45S particle이 축적되는 리보솜 프로파일을 나타낸다[28]. 이는 GroEL이 50S 리보솜 소단위체의 조립 후반 과정에 관여한다는 것을 말해준다.

30S ribosomal subunit assembly factors

30S 리보솜 소단위체 조립은 16S rRNA 전구체에 21개의 리보솜 단백질들이 차례로 결합하여 이루어진다. 50S 리보솜 소단위체와 마찬가지로 야생형 균주에서는 중간산물이 관찰되지 않으나, 리보솜 단백질, 리보솜 조립인자 등에 돌연변이가 일어난 돌연변이체에서는 2가지 중간산물이 발견되었다[37, 38, 66, 70]. 먼저 16S rRNA 전구체에 10개 리보솜 단백질들이 결합된 21S particle이 나타나며, 이 21S particle에 11개의 리보솜 단백질이 더 결합하여 리보솜 단백질은 모두 가지고 있으나 16S rRNA의 가공이 이루어지지 않은 30S particle이 중간산물로 나타난다[67, 68].

이러한 30S 리보솜 소단위체 조립인자로는 GTPase인 Era, RsgA와 16S rRNA 메틸전이효소인 KsgA, 리보솜 단백질 아세틸화효소인 RimJ, 샤페론인 DnaK 그리고 마지막으로 아직

그 기능이 많이 밝혀지지 않은 RbfA, RimM, RimP, 등이 관여한다(Table. 1). 50S 리보솜 소단위체의 경우 리보솜 상의 결합 부위가 아직 많이 밝혀지지 않은데 반해, 30S 리보솜 소단위체 조립인자 중 Era [94], RsgA [36], KsgA [113], RbfA [24]는 리보솜과 결합한 상태의 복합체로 구조가 규명되어 30S 리보솜 조립 메커니즘은 비교적 많이 연구되어 있다. 이들은 모두 리보솜의 해독중심(decoding center)에 결합하여 이 부분의 성숙에 관여하여 30S의 해독기능에 중요한 역할을 한다고 사료된다.

Era

Era는 세포 주기 조절[8], 세포생장[51], 리보솜 조립[7, 107] 등, 세포 내에서 다양한 기능을 하는 GTPase로, GTPase 활성을 가지는 N 말단 영역(G-domain)과 RNA 인식과 결합에 관여하는 C 말단 영역(KH-domain)으로 구성되어 있다[19]. 이 두 가지 도메인 모두 Era의 기능에 필수적이거나 이 두 도메인간의 관계는 아직 밝혀지지 않았다[65, 86].

세포 내에서 Era가 결핍되면, 70S 리보솜의 감소와 30S와 50S 리보솜 소단위체의 증가현상이 나타나며[91], 16S rRNA의 전구체인 17S rRNA가 축적된다[50].

Era는 30S 리보솜 소단위체에서 16S rRNA 3' 말단 부위가 위치한 head와 platform부분 사이에 결합하여 16S rRNA 가공과 성숙을 위해 샤페론을 불러오며, 16S rRNA 가공과정이 끝날 때까지 30S 리보솜 소단위체에 붙어 조립과정의 checkpoint역할을 하는 것이라 추측된다[11, 73, 91, 107]. 또한 Era와 30S 리보솜 소단위체와의 결합은 50S 리보솜 소단위체의 결합을 막기 위한 구조를 유지하고 있다[94].

RsgA

GTPase인 RsgA는 GTP 존재시 RsgA-30S 리보솜 소단위체의 결합이 더 강해진다[22,44]. RsgA의 GTPase 활성은 30S 리보솜 소단위체와 결합 시 130-170배가량 증가하여 30S 리보솜 소단위체에 의존적이라고 할 수 있다[22, 44].

RsgA의 결손은 17S rRNA와 리보솜 소단위체들을 축적시켜 세포성장을 심각하게 저해시키며[44], 높은 농도의 염에 대해 저항성을 가지게 한다[41].

16S rRNA에 수식이 일어나는 부분은 11군데 존재하는데, 이들은 리보솜의 해독중심에 집중되어있으며 RsgA 결합부위와도 인접해 있다[36]. 이로부터 RsgA가 30S 리보솜 소단위체 조립과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 실제로 RsgA의 결합부위는 tRNA가 결합하는 A-, P-site, 50S 리보솜 소단위체, 리보솜 단백질, 번역개시인자(translation initiation factor)들의 결합부위와 중첩되며[16, 60, 72, 93], Era [94], KsgA [113], RbfA [24]와 같은 다른 여러 리보솜 조립인자들이 결합하는 자리이다. 최근 30S 리보솜 소단위체 조립과정 중 RbfA와 RsgA가 어떻게 상호작용하며 관여하는 메커니

증이 밝혀졌다. RbfA는 cold-shock protein으로 낮은 온도에서 16S rRNA의 5' 끝부분을 가공하는데[55, 112], 이러한 RbfA를 30S 리보솜 소단위체로부터 제거하는 과정을 RsgA가 촉진한다[33]. 따라서 RsgA는 RbfA 뿐만 아니라 다른 여러 리보솜 조립인자들을 방출시키거나 번역개시인자, 50S 리보솜 소단위체, tRNA들의 결합을 막음으로써 30S 리보솜 소단위체 조립과정의 후반 과정에서 checkpoint의 역할을 하고 있는 것이라고 추측된다.

KsgA

KsgA는 16S rRNA 메틸전이효소로서, 16S rRNA 3' 말단에 존재하는 helix45 내의 A1518, A1519를 메틸화시키며[21, 43], 이러한 메틸화가 일어나는 A1518, A1519는 잘 보존되어 있는 편이다[84].

KsgA는 naked 16S rRNA에는 메틸화를 일으키지 않는 것으로 보아[43], 거의 다 성숙된 30S 리보솜 소단위체에 결합한 16S rRNA를 메틸화시키며, 이때 S6, S8, S11, S15, S18, S21 등과 같은 리보솜 단백질들을 필요로 한다[25, 101].

ksgA-deletion strain에서 A1518, A1519의 비메틸화는 17S rRNA 전구체를 축적시켜 비정상적인 리보솜 프로파일을 나타내며, 저온에서 성장속도가 느려진다[21, 43].

메틸화가 불활성화된 KsgA를 과발현시키면 70S 리보솜의 양은 줄어들고 30S 리보솜 소단위체-KsgA 복합체가 축적되는 것을 볼 수 있는데, 30S 리보솜 소단위체에 강하게 결합하며, Initiation Factor 3 (IF3)의 결합을 막아 미성숙한 30S 리보솜 소단위체의 번역개시를 막는다[21, 113]. 따라서 KsgA에 의한 16S rRNA의 메틸화는 KsgA의 방출을 촉진시키며, IF3와 50S 리보솜 소단위체가 30S 리보솜 소단위체에 결합하는 것을 도와 30S 리보솜 소단위체의 조립과정에서 checkpoint로서의 역할을 하고 있다[5, 113].

30S 리보솜 소단위체 조립인자이기는 하나 아직 그 역할이 자세하게는 알려지지 않은 RbfA의 과발현은 세포의 성장에 영향을 주지 않는다. 그러나 *ksgA*-deletion strain에서 RbfA를 과발현시키면 정상성장 조건에서도 생장이 심각하게 저해되는 것을 관찰 할 수 있었고, 이는 S21이 결합되지 않은 미성숙한 70S-like particle이 축적되기 때문이다[20]. 뿐만 아니라 S5를 아세틸화시키는 RimJ도 *ksgA*-deletion strain에서 과발현될 경우 심각한 성장저해를 일으킨다[20]. 이러한 결과들로부터 KsgA에 의해 이루어지는 리보솜 조립과정 중의 checkpoint가 다른 리보솜 조립인자들의 작용에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

RbfA

Cold-shock inducible protein 중의 하나인 RbfA (ribosome binding factor A)는 저온뿐만 아니라 정상적인 조건에서도 *E. coli*의 성장에 필수적인 단백질 중 하나이다[23, 56, 102, 112]

. RbfA-30S 결합구조의 관찰을 통해 RbfA가 mRNA 해독과 tRNA 결합에 중요한 16S rRNA의 helix44 부분과 helix45 부분을 노출시킨다는 것이 밝혀졌는데[24], 이렇게 드러난 helix44 부위에 다른 조립인자들이 결합하여 리보솜 합성의 다음 단계가 진행되며, 결합되어 있던 RbfA는 GTPase RsgA에 의해 제거된다[33].

RimJ

RimJ는 30S 리보솜 소단위체의 조립에 관여하는 N-terminal acetylase로, 16S rRNA와 결합한 리보핵산단백질 복합체 상태인 pre-30S 리보솜 소단위체와 결합하여 S5를 아세틸화시킨다[89, 114]. S5의 아세틸화는 tRNA의 결합과 mRNA 번역의 정확성에 영향을 준다[61].

RimJ의 과발현은 S5 돌연변이체의 저온민감성 growth defect, 번역과정의 정확성 감소, 리보솜 조립과정의 결함과 같은 표현형을 억제하며, 이러한 효과는 RimJ의 아세틸화 활성에 의존적인 것으로 보아, RimJ의 아세틸화 활성은 리보솜 조립에 필수적인 것을 알 수 있다[89].

RimM

RimM은 DNA 서열상 *trmD* 오페론에 위치하여 있으며[14], *trmD* 오페론에는 리보솜 단백질인 S16, L19와 tRNA 메틸전이효소인 TrmD를 암호화하는 유전자들이 있다. 이러한 DNA상의 위치는 RimM이 리보솜과 연관된 기능을 가지고 있다는 것을 말해준다[14].

RimM은 *in vivo*에서 30S 리보솜 소단위체와 결합하는 것이 확인되었으며, *in vitro*에서 S19와 결합함을 보였다[12, 69, 99]. 이렇게 30S 리보솜 소단위체와 결합한 RimM은 3'-domain protein들의 조립을 도울 뿐만 아니라 rRNA의 3차구조를 안정화시킨다[35].

rimM-deletion strain은 느린 성장속도를 보이며[12], 16S rRNA 전구체인 17S rRNA가 축적되어 30S 리보솜 소단위체의 전구체가 관찰된다[13, 35]. *rimM*-deletion strain의 미성숙한 30S 리보솜 소단위체에 존재하는 16S rRNA 구조는 head domain이 body domain으로부터 60° 회전된 상태로, 정상적인 세포의 16S rRNA의 구조와 차이가 있다[35]. *rimM*-deletion strain에 존재하는 미성숙한 30S 리보솜 소단위체에는 3'-head domain protein인 S10, S14, S13, S19가 존재하지 않는다[35], S13을 암호화하는 *tpsM2*의 자발적 돌연변이결과 *rimM*-deletion strain의 성장결함이 복구되는 것이 관찰되었다[12]. RimM (Y106A, Y107A) 돌연변이체 또한 *rimM*-deletion strain와 같은 표현형을 나타내는데, 이러한 표현형은 S13 (Δ 89-99), S19 (S19H83Y)의 돌연변이에 의해 회복되는 것을 볼 수 있었다[69]. 뿐만 아니라 16S rRNA의 helix31, helix33b에 돌연변이를 일으킨 경우에도 회복되는 것을 볼 수 있었다[69].

RimP

RimP는 RbfA와 같은 오페론 내에 암호화되어 있으며, *rimP*-deletion strain은 다른 리보솜 조립인자 결손 균주들과는 달리 높은 온도에서 느린 성장속도를 나타낸다. 또한 50S에 비해 30S 리보솜 소단위체가 적게 존재하며, 미성숙한 16S rRNA가 축적된다[83].

DnaK

DnaK는 Hsp70에 속하는 단백질 샤페론으로, 열 충격을 받게 되면 ATP 존재하에 폴리펩티드의 소수성 부분을 안정화시킨다[10]. 뿐만 아니라 S4, S12, S17, S21에는 강하게, 상대적으로 S3, S5, S8, S16, S19와는 약하게 결합하여 그 조립에 관여한다[71].

45°C에서 DnaK의 온도감수성 돌연변이체는 70S 리보솜을 줄어드는 반면 30S, 50S 리보솜 소단위체의 전구체는 증가하는 현상을 나타낸다[1]. 이러한 돌연변이체에서 관찰되는 50S 소단위체 전구체로는 32S와 45S가 존재하며[1], 둘 다 23S rRNA 전구체를 가지고 있으나, 45S 전구체에 존재하는 23S rRNA의 전구체는 32S 전구체에 존재하는 23S rRNA에 비해 5', 3' extension 부위가 잘려있어 보다 더 성숙된 형태이다[39]. 45S 전구체에는 L2, L6, L9, L16, L25, L27, L28, L30, L32와 같은 리보솜 단백질들이 결핍되어있다[39]. 30S 소단위체 전구체의 경우 21S로 존재하며, 5', 3' extension이 포함된 17S rRNA를 포함하고 있다[1,39]. 이 전구체의 리보솜 단백질 조성을 살펴보면, S3, S10, S14, S21이 결핍되어있으며, S1, S2, S5의 양이 감소되어 있었다[39]. 이러한 DnaK의 온도감수성 돌연변이체의 표현형들은 S4의 과발현에 의해 억제된다[71].

dnaK-deletion strain은 45°C에서 온도감수성 돌연변이체와 유사한 결합들을 가지나, 30°C 이하에서는 정상적인 표현형을 가진다[28]. 이는 DnaK가 30°C 이하의 온도조건에서는 리보솜 조립에 필요하지 않다는 것을 의미한다[28].

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의해 연구되었음.

References

- Alix, J. H. and Guerin, M. F. 1993. Mutant DnaK chaperones cause ribosome assembly defects in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9725-9729.
- Bharat, A., Jiang, M., Sullivan, S. M., Maddock, J. R. and Brown, E. D. 2006. Cooperative and critical roles for both G domains in the GTPase activity and cellular function of ribosome-associated *Escherichia coli* EngA. *J Bacteriol* **188**, 7992-7996.
- Blombach, F., Launay, H., Zorraquino, V., Swarts, D. C., Cabrita, L. D., Benelli, D., Christodoulou, J., Londei, P. and van der Oost, J. 2011. An HflX-type GTPase from *Sulfolobus solfataricus* binds to the 50S ribosomal subunit in all nucleotide-bound states. *J Bacteriol* **193**, 2861-2867.
- Boddeker, N., Stade, K. and Franceschi, F. 1997. Characterization of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD box protein with ATP independent RNA unwinding activity. *Nucleic Acids Res* **25**, 537-545.
- Boehringer, D., O'Farrell, H. C., Rife, J. P. and Ban, N. 2012. Structural insights into methyltransferase KsgA function in 30S ribosomal subunit biogenesis. *J Biol Chem* **287**, 10453-10459.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Britton, R. A. 2009. Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annu Rev Microbiol* **63**, 155-176.
- Britton, R. A., Powell, B. S., Dasgupta, S., Sun, Q., Margolin, W., Lupski, J. R. and Court, D. L. 1998. Cell cycle arrest in Era GTPase mutants: a potential growth rate regulated checkpoint in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**, 739-750.
- Bügl, H., Fauman, E. B., Staker, B. L., Zheng, F., Kushner, S. R., Saper, M. A., Bardwell, J. C. and Jakob, U. 2000. RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* **6**, 349-360.
- Bukau, B. and Horwich, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.
- Bunner, A. E., Nord, S., Wikström, P. M. and Williamson, J. R. 2010. The Effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution. *J Mol Biol* **398**, 1-79.
- Bylund, G. O., Persson, B. C., Lundberg, L. A. and Wikstrom, P. M. 1997. A novel ribosome-associated protein is important for efficient translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 4567-4574.
- Bylund, G. O., Wipemo, L. C., Lundberg, L. A. and Wikstrom, P. M. 1998. RimM and RbfA are essential for efficient processing of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 73-82.
- Bystrom, A. S., Hjalmarsson, K. J., Wikstrom, P. M. and Bjork, G. R. 1983. The nucleotide sequence of an *Escherichia coli* operon containing genes for the tRNA(m1G)methyltransferase, the ribosomal proteins S16 and L19 and a 21-K polypeptide. *EMBO J* **2**, 899-905.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J. and Richarme, G. 2000. The FtsJ/Rmj heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* **275**, 16414-16419.
- Carter, A. P., Clemons, W. M. Jr, Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. 2001. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* **291**, 498-501.
- Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M. and Iost, I. 2003. The DEAD box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**, 1253-1265.
- Charollais, J., Dreyfus, M. and Iost, I. 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.
19. Chen, X., Court, D. L. and Ji, X. 1999. Crystal structure of ERA: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8396-8401.
 20. Connolly, K. and Culver, G. 2013. Overexpression of RbfA in the absence of the KsgA checkpoint results in impaired translation initiation. *Mol Microbiol* **87**, 968-981.
 21. Connolly, K., Rife, J. P. and Culver, G. 2008. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. *Mol Microbiol* **70**, 1062-1075.
 22. Daigle, D. M. and Brown, E. D. 2004. Studies of the interaction of *Escherichia coli* YjeQ with the ribosome in vitro. *J Bacteriol* **186**, 1381-1387.
 23. Dammel, C. S. and Noller, H. F. 1995. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* **9**, 626-637.
 24. Datta, P. P., Wilson, D. N., Kawazoe, M., Swami, N. K., Kaminishi, T., Sharma, M. R., Booth, T. M., Takemoto, C., Fucini, P. and Yokoyama, S. 2007. Structural aspects of RbfA action during small ribosomal subunit assembly. *Mol Cell* **28**, 434-445.
 25. Desai, P. M. and Rife, J. P. 2006. The adenosine dimethyltransferase KsgA recognizes a specific conformational state of the 30S ribosomal subunit. *Arch Biochem Biophys* **449**, 57-63.
 26. Diges, C. M. and Uhlenbeck, O. C. 2001. *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J* **20**, 5503-5512.
 27. Dutta, D., Bandyopadhyay, K., Datta, A. B., Sardesai, A. A. and Parrack, P. 2009. Properties of HflX, an enigmatic protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**, 2307-2314.
 28. El Hage, A., Sbai, M. and Alix, J. 2001. The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **264**, 796-808.
 29. Elles, L. M. and Uhlenbeck, O. C. 2008. Mutation of the arginine finger in the active site of *Escherichia coli* DbpA abolishes ATPase and helicase activity and confers a dominant slow growth phenotype. *Nucleic Acids Res* **36**, 41-50.
 30. Engels, S., Ludwig, C., Schweitzer, J., Mack, C., Bott, M. and Schaffer, S. 2005. The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **57**, 576-591.
 31. Feng, B., Mandava, C. S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., Li, N., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Z. and Wu, J. 2014. Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol* **12**, e1001866.
 32. Fischer, J. J., Coatham, M. L., Eagle Bear, S., Brandon, H. E., De Laurentiis, E. I., Shields, M. J. and Wieden, H. 2012. The ribosome modulates the structural dynamics of the conserved GTPase HflX and triggers tight nucleotide binding. *Biochimie* **94**, 1647-1659.
 33. Goto, S., Kato, S., Kimura, T., Muto, A. and Himeno, H. 2011. RsgA releases RbfA from 30S ribosome during a late stage of ribosome biosynthesis. *EMBO J* **30**, 104-114.
 34. Green, R. and Noller, H. F. 1999. Reconstitution of functional 50S ribosomes from *in vitro* transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* **38**, 1772-1779.
 35. Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Feng, B., Xu, Y., Muto, A., Himeno, H., Deng, H., Lei, J. and Gao, N. 2013. Dissecting the *in vivo* assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process. *Nucleic Acids Res* **41**, 2609-2620.
 36. Guo, Q., Yuan, Y., Xu, Y., Feng, B., Liu, L., Chen, K., Sun, M., Yang, Z., Lei, J. and Gao, N. 2011. Structural basis for the function of a small GTPase RsgA on the 30S ribosomal subunit maturation revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13100-13105.
 37. Guthrie, C., Nashimoto, H. and Nomura, M. 1969. Structure and function of *E. coli* ribosomes. 8. Cold-sensitive mutants defective in ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **63**, 384-391.
 38. Guthrie, C., Nashimoto, H. and Nomura, M. 1969. Studies on the assembly of ribosomes *in vivo*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **34**, 69-75.
 39. Hage, A. E. and Alix, J. 2004. Authentic precursors to ribosomal subunits accumulate in *Escherichia coli* in the absence of functional DnaK chaperone. *Mol Microbiol* **51**, 189-201.
 40. Hager, J., Staker, B. L., Bugl, H. and Jakob, U. 2002. Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *J Biol Chem* **277**, 41978-41986.
 41. Hase, Y., Yokoyama, S., Muto, A. and Himeno, H. 2009. Removal of a ribosome small subunit-dependent GTPase confers salt resistance on *Escherichia coli* cells. *RNA* **15**, 1766-1774.
 42. Hayes, F. and Hayes, D. 1971. Biosynthesis of ribosomes in *E. coli*. I.—Properties of ribosomal precursor particles and their RNA components. *Biochimie* **53**, 369-382.
 43. Helser, T. L., Davies, J. E. and Dahlberg, J. E. 1972. Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nature* **235**, 6-9.
 44. Himeno, H., Hanawa-Suetsugu, K., Kimura, T., Takagi, K., Sugiyama, W., Shirata, S., Mikami, T., Odagiri, F., Osanai, Y., Watanabe, D., Goto, S., Kalachnyuk, L., Ushida, C. and Muto, A. 2004. A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucleic Acids Res* **32**, 5303-5309.
 45. Holmes, K. L. and Culver, G. M. 2005. Analysis of conformational changes in 16S rRNA during the course of 30S subunit assembly. *J Mol Biol* **354**, 340-357.
 46. Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Hartl, F. U. 1999. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**, 147-154.
 47. Hwang, J. and Inouye, M. 2010. A Bacterial GAP-Like Protein, YihL, Regulating the GTPase of Der, an Essential GTP-Binding Protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **399**, 759-772.
 48. Hwang, J. and Inouye, M. 2006. The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**, 1660-1672.

49. Hwang, J. and Inouye, M. 2001. An essential GTPase, der, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **276**, 31415-31421.
50. Inoue, K., Alsina, J., Chen, J. and Inouye, M. 2003. Suppression of defective ribosome assembly in a rbfA deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**, 1005-1016.
51. Inoue, K., Chen, J., Kato, I. and Inouye, M. 2002. Specific growth inhibition by acetate of an *Escherichia coli* strain expressing Era-dE, a dominant negative Era mutant. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 379-388.
52. Iost, I. and Dreyfus, M. 2006. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **34**, 4189-4197.
53. Jain, N., Dhimole, N., Khan, A. R., De, D., Tomar, S. K., Sajish, M., Dutta, D., Parrack, P. and Prakash, B. 2009. *E. coli* HflX interacts with 50S ribosomal subunits in presence of nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 201-205.
54. Jain, C. 2008. The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA* **14**, 381-389.
55. Jones, P. G. and Inouye, M. 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold shock protein whose absence triggers the cold shock response. *Mol Microbiol* **21**, 1207-1218.
56. Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. and Inouye, M. 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 76-80.
57. Karginov, F. V., Caruthers, J. M., Hu, Y., McKay, D. B. and Uhlenbeck, O. C. 2005. YxiN is a modular protein combining a DEx(D/H) core and a specific RNA-binding domain. *J Biol Chem* **280**, 35499-35505.
58. Karginov, F. V. and Uhlenbeck, O. C. 2004. Interaction of *Escherichia coli* DbpA with 23S rRNA in different functional states of the enzyme. *Nucleic Acids Res* **32**, 3028-3032.
59. Khaitovich, P., Tenson, T., Kloss, P. and Mankin, A. S. 1999. Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA. *Biochemistry* **38**, 1780-1788.
60. Kimura, T., Takagi, K., Hirata, Y., Hase, Y., Muto, A. and Himeno, H. 2008. Ribosome-small-subunit-dependent GTPase interacts with tRNA-binding sites on the ribosome. *J Mol Biol* **381**, 467-477.
61. Kirthi, N., Roy-Chaudhuri, B., Kelley, T. and Culver, G. M. 2006. A novel single amino acid change in small subunit ribosomal protein S5 has profound effects on translational fidelity. *RNA* **12**, 2080-2091.
62. Koller-Eichhorn, R., Marquardt, T., Gail, R., Wittinghofer, A., Kostrewa, D., Kutay, U. and Kambach, C. 2007. Human OLA1 defines an ATPase subfamily in the Obg family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem* **282**, 19928-19937.
63. Kossen, K., Karginov, F. V. and Uhlenbeck, O. C. 2002. The carboxy-terminal domain of the DExDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA. *J Mol Biol* **324**, 625-636.
64. Krzyzosiak, W., Denman, R., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Gehrke, C., Agris, P. and Ofengand, J. 1987. In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome. *Biochemistry* **26**, 2353-2364.
65. Lerner, C. G., Gulati, P. S. and Inouye, M. 1995. Cold sensitive conditional mutations in Era, an essential *Escherichia coli* GTPase, isolated by localized random polymerase chain reaction mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 291-298.
66. Lewandowski, L. J. and Brownstein, B. L. 1966. An altered pattern of ribosome synthesis in a mutant of *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **25**, 554-561.
67. Lindahl, L. 1975. Intermediates and time kinetics of the *in vivo* assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* **92**, 15-37.
68. Lindahl, L. 1973. Two new ribosomal precursor particles in *E. coli*. *Nature* **243**, 170-172.
69. Lovgren, J. M., Bylund, G. O., Srivastava, M. K., Lundberg, L. A., Persson, O. P., Wingsle, G. and Wikstrom, P. M. 2004. The PRC-barrel domain of the ribosome maturation protein RimM mediates binding to ribosomal protein S19 in the 30S ribosomal subunits. *RNA* **10**, 1798-1812.
70. MacDonald, R. E., Turnock, G. and Forchhammer, J. 1967. The synthesis and function of ribosomes in a new mutant of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **57**, 141-147.
71. Maki, J. A., Schnobrich, D. J. and Culver, G. M. 2002. The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Mol Cell* **10**, 129-138.
72. McCutcheon, J. P., Agrawal, R. K., Phillips, S. M., Grassucci, R. A., Gerchman, S. E., Clemons, W. M., Jr, Ramakrishnan, V. and Frank, J. 1999. Location of translational initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4301-4306.
73. Meier, T. L., Peery, R. B., McAllister, K. A. and Zhao, G. 2000. Era GTPase of *Escherichia coli*: binding to 16S rRNA and modulation of GTPase activity by RNA and carbohydrates. *Microbiology* **146** (Pt 5), 1071-1083.
74. Moll, I., Grill, S., Gründling, A. and Bläsi, U. 2002. Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**, 1387-1396.
75. Morimoto, T., Loh, P. C., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S. and Ogasawara, N. 2002. Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**, 3539-3552.
76. Nicol, S. M. and Fuller-Pace, F. V. 1995. The "DEAD box" protein DbpA interacts specifically with the peptidyl-transferase center in 23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 11681-11685.
77. Niereaus, K. H., Bordsch, K. and Homann, H. E. 1973. Ribosomal proteins. *J Mol Biol* **74**, 587-597.
78. Nierhaus, K. H. 1991. The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie* **73**, 739-755.
79. Nierhaus, K. H. and Dohme, F. 1974. Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**, 4713-4717.
80. Nishi, K., Morel-Deville, F., Hershey, J. W., Leighton, T. and Schnier, J. 1988. An eIF-4A-like protein is a suppressor of

- an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. *Nature* **336**, 496-498.
81. Nishimura, M., Yoshida, T., Shirouzu, M., Terada, T., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Ohkubo, T. and Kobayashi, Y. 2004. Solution Structure of Ribosomal Protein L16 from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol* **344**, 1369-1383.
 82. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. and Steitz, T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930.
 83. Nord, S., Bylund, G. O., Lövgren, J. M. and Wikström, P. M. 2009. The RimP protein is important for maturation of the 30S ribosomal subunit. *J Mol Biol* **386**, 742-753.
 84. O'Farrell, H. C., Pulicherla, N., Desai, P. M. and Rife, J. P. 2006. Recognition of a complex substrate by the KsgA/Dim1 family of enzymes has been conserved throughout evolution. *RNA* **12**, 725-733.
 85. Peil, L., Virumäe, K. and Remme, J. 2008. Ribosome assembly in *Escherichia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA. *FEBS J* **275**, 3772-3782.
 86. Pillutla, R. C., Sharer, J. D., Gulati, P. S., Wu, E., Yamashita, Y., Lerner, C. G., Inouye, M. and March, P. E. 1995. Cross-species complementation of the indispensable *Escherichia coli* era gene highlights amino acid regions essential for activity. *J Bacteriol* **177**, 2194-2196.
 87. Polach, K. J. and Uhlenbeck, O. C. 2002. Cooperative binding of ATP and RNA substrates to the DEAD/H protein DbpA. *Biochemistry* **41**, 3693-3702.
 88. Prud'homme-Généreux, A., Beran, R. K., Iost, I., Ramey, C. S., Mackie, G. A. and Simons, R. W. 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**, 1409-1421.
 89. Roy Chaudhuri, B., Kirthi, N., Kelley, T. and Culver, G. M. 2008. Suppression of a cold sensitive mutation in ribosomal protein S5 reveals a role for RimJ in ribosome biogenesis. *Mol Microbiol* **68**, 1547-1559.
 90. Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K. and Wada, C. 2005. The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* **10**, 393-408.
 91. Sayed, A., Matsuyama, S. and Inouye, M. 1999. Era, an Essential *Escherichia coli* Small G-Protein, Binds to the 30S Ribosomal Subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 51-54.
 92. Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Cate, J. H. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834.
 93. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. 4th., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. 2006. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935-1942.
 94. Sharma, M. R., Barat, C., Wilson, D. N., Booth, T. M., Kawazoe, M., Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Fucini, P. and Agrawal, R. K. 2005. Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit: implications for 30S subunit assembly. *Mol Cell* **18**, 319-329.
 95. Sharpe Elles, L. M., Sykes, M. T., Williamson, J. R. and Uhlenbeck, O. C. 2009. A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **37**, 6503-6514.
 96. Shields, M. J., Fischer, J. J. and Wieden, H. 2009. Toward understanding the function of the universally conserved GTPase HflX from *Escherichia coli*: a kinetic approach. *Biochemistry* **48**, 10793-10802.
 97. Sohlberg, B., Lundberg, U., Hartl, F. U. and von Gabain, A. 1993. Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 277-281.
 98. Spillmann, S., Dohme, F. and Nierhaus, K. H. 1977. Assembly *in Vitro* of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: Proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *J Mol Biol* **115**, 513-523.
 99. Suzuki, S., Tatsuguchi, A., Matsumoto, E., Kawazoe, M., Kaminishi, T., Shirouzu, M., Muto, Y., Takemoto, C. and Yokoyama, S. 2007. Structural characterization of the ribosome maturation protein, RimM. *J Bacteriol* **189**, 6397-6406.
 100. Tan, J., Jakob, U. and Bardwell, J. C. 2002. Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol* **184**, 2692-2698.
 101. Thammana, P. 1974. Methylation of 16S RNA during ribosome assembly *in vitro* *Nature* **251**, 682-686.
 102. Thieringer, H. A., Jones, P. G. and Inouye, M. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**, 49-57.
 103. Tomar, S. K., Dhimole, N., Chatterjee, M. and Prakash, B. 2009. Distinct GDP/GTP bound states of the tandem G-domains of EngA regulate ribosome binding. *Nucleic Acids Res* **37**, 2359-2370.
 104. Traub, P. and Nomura, M. 1968. Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**, 777-784.
 105. Trubetskoy, D., Proux, F., Allemand, F., Dreyfus, M. and Iost, I. 2009. SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA *in vivo* *Nucleic Acids Res* **37**, 6540-6549.
 106. Tsu, C. A. and Uhlenbeck, O. C. 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.
 107. Tu, C., Zhou, X., Tropea, J. E., Austin, B. P., Waugh, D. S., Court, D. L. and Ji, X. 2009. Structure of ERA in complex with the 3' end of 16S rRNA: implications for ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 14843-14848.
 108. Wang, S., Hu, Y., Overgaard, M. T., Karginov, F. V., Uhlenbeck, O. C. and McKay, D. B. 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.
 109. Williamson, J. R. 2005. Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Q Rev Biophys* **38**, 397-403.
 110. Williamson, J. R. 2003. After the ribosome structures: how

- are the subunits assembled? *RNA* **9**, 165-167.
111. Wittinghofer, A. and Pal, E. F. 1991. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* **16**, 382-387.
112. Xia, B., Ke, H., Shinde, U. and Inouye, M. 2003. The role of RbfA in 16S rRNA processing and cell growth at low temperature in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **332**, 575-584.
113. Xu, Z., O'Farrell, H. C., Rife, J. P. and Culver, G. M. 2008. A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 534-536.
114. Yoshikawa, A., Isono, S., Sheback, A. and Isono, K. 1987. Cloning and nucleotide sequencing of the genes rimI and rimJ which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **209**, 481-488.

초록 : *Escherichia coli*에서 리보솜 조립과정에 관여하는 단백질들

최은실 · 황지환*

(부산대학교 생명시스템학과)

리보솜은 mRNA상의 유전정보를 단백질로 번역하는 세포에 필수적인 거대복합체이다. 이러한 리보솜은 리보핵산단백질 복합체로, rRNA와 리보솜 단백질로 이루어져있다. 리보솜 조립과정은 리보솜 단백질 이외에도 많은 조립인자들이 각 구성요소의 조립을 도움으로써 이루어진다. 세포 내 리보솜 조립과정에 참여하는 조립인자들로 GTPase, ATPase, 샤페론, RNA helicase, 수식효소 등 다양한 단백질들이 알려졌다. 리보솜 조립과정 중 이러한 조립인자들은 리보솜 단백질 또는 rRNA의 수식에 참여하거나, 리보솜 단백질들과 rRNA의 조립 등을 돕는다. 이러한 리보솜 조립인자들에 관한 유전학적, 구조적, 생화학적 실험결과들이 많이 존재하지만 정확한 리보솜 조립과정과 이러한 조립인자들의 역할에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다. 현재까지의 연구결과를 바탕으로 *E. coli*의 리보솜 조립과정을 돕는 단백질들에 대하여 알아보고자 한다.