

## *Saccharomyces uvarum*의 Catabolic Repression 시기에 유도되는 Ribosomal Ribonuclease에 대한 연구

윤 성 녀 · 이 기 성\* · 최 영 길  
한양대학교 생물학과 · 배제대학 생물학과\*

### Induction of Ribosomal Ribonuclease during Catabolic Repression in *Saccharomyces uvarum*

Seong Nyo Yoon, Ki Sung Lee\* and Yong Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133 and  
Bae Jei College\*, Daejeon 300-01, Korea

**Abstract:** In order to study subcellular locality and characteristics of ribonuclease in *Saccharomyces uvarum*, subcellular fractions 45,000 x g pellet fraction, post ribosomal fraction and ribosome fraction were extracted during late log, stationary phase and sugar starvation conditions. Ribonuclease activity was significantly increased in ribosomal fraction under stationary and sugar starvation conditions. Ribosomal ribonuclease was extracted by EDTA plus streptomycin sulfate and ammonium sulfate precipitation. The amount of ribosome in stationary and sugar starvation condition was decreased three to six fold as compared to that in the early log phase. The end products of ribosomal ribonuclease were detected by thin layer chromatography. It is postulated that the increase of ribosomal ribonuclease activity under sugar starvation results from 5'-rRNase, while the increase of rRNase activity under stationary phase results from 3'-rRNase.

**Keywords:** *Saccharomyces uvarum*, 5'-rRNase, 3'-rRNase, Catabolic repression.

RNase는 phosphodiester bond를 끊어 RNA를 가수 분해하는 효소로서 크게 나누어 생물학적 기능과 localization에 따라 구분할 수 있으며 기질에 대한 특이성, 이온 요구성, 생성물에 따라 세분할 수 있다.

기능적인 측면에서 볼 때 RNase P는 원핵세포(Harste, 1982)나 진핵세포에서 tRNA를 maturation시키며 RNase III는 원핵세포의 rRNA processing에 작용하고 진핵세포에서는 RNA polymerase가 이러한 기능을 대신한다. RNase II, III(Niyogi and Datta, 1975)는 원핵세포의 mRNA를 degradation시키며 진핵세포의 mRNA processing 과정에도 역시 endonuclease가 작용한다.

세포내에서의 정확한 기능은 밝혀져 있지 않지만 3'에서 절단을 하여 3'-mononucleotide을 내며 endonuclease인 RNase I과 oligonucleotide을 자르는 oligonuclease(Niyogi and Datta, 1975) 등이 있다.

RNase를 locality에 따라 구분해 보면 세포질에 존재하는 효소와 ribosome에 존재하는 효소로 나뉘 볼 수 있다.

본 연구에서는 효모 세포(*S. uvarum*)을 사용하여 정상 배양 시기나 sugar starvation시켰을 때 subcellular 분획구(45,000 x g pellet 분획구, post ribosomal 분획구, ribosomal 분획구)에서 나타나는 RNase 활성도를 비교하고자 하였고, TLC를 사용하여 rRNase의 가수 분해 형태를 조사함과 아울러 정상 배양 세포와 sugar starvation시킨 세포에서 특이하게 유도 또는 출현되는 rRNase를 규명하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 배지

효모 세포(*S. uvarum* ATCC 9080)를 실험 균주로

사용하였고 배양을 위해서는 다음과 같은 배지를 사용하였다.

1) 완전 배지(YE 배지)

peptone 1 g, yeast extract 5 g, glucose 20g, H<sub>2</sub>O 1 l를 혼합하여 조제하였다. 효모 세포는 완전 배지에서 30°C로 24 시간 전배양하여 수확한 다음 다시 완전 배지에서 30°C로 진탕 배양(90 rpm)하여 early log phase(YE(E)), late log phase(YE(L)), stationary phase(YE(S))때의 세포를 각각 수확하였다.

2) Sugar가 결핍된 Knopp's 배지

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g, KCl 0.12 g, FeCl<sub>3</sub> trace, H<sub>2</sub>O 1 l를 혼합하여 사용하였다. sugar starvation시킨 세포를 얻기 위하여 YE배지에서 30°C로 24 시간 전배양하여 수확한 후 sugar가 결핍된 Knopp's배지에서 30°C로 각 3 시간(S-(3)), 6 시간(S-(6)) 진탕 배양(90 rpm)하였다.

**Ribosome과 Subcellular** 분획구의 분리

Harder 등 (1980)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다(Table 1).

수확된 세포를 NaHCO<sub>3</sub>가 0.1 M 농도로, Triton X-100은 1% 농도가 되도록 조정된 buffer (A) (30 mM Tris-HCl, pH 7.5/200 mM KCl/5 mM MgCl<sub>2</sub>/20% glycerol/0.25 mM EDTA/6 mM 2-mercaptoethanol)에 현탁시켜서 40°C로 5 시간 incubation하고, 4°C에서 1 분 간격으로 2 시간 초음파 마쇄하였다(sonic dismembrator, Fisher, mode 300, microtip 사용).

이 homogenate를 4°C, 45,000 x g(Beckman, T2-21)에서 30 분간 원심 분리하였고 pellet 은 10 mM농도가 되도록 EDTA를 처리한 buffer(A)에 resuspension시켰다. 다시 45,000×g에서 4°C, 30 분간 원심 분리한 후 상등액을 RNase 활성도 측정을 위해 사용하였다(Fraction 1).

homogenate에서 처음 분리한 상등액은 1 M sucrose chusion을 주어 130,000×g(Hitachi, 65 p-7)에서 4°C로 18 시간 초고속 원심분리한 후 상등액을 RNase의 활성도 측정을 위하여 사용하였고 pellet은 buffer(A)에 현탁(Fraction 3) 하여 ribosome양과 활성도 측정에 사용하였다.

ribosome의 양은 Swida와 Harder (1981)의 방법에 따라 260 nm(Shimazu, UV 150-02)에서 흡광도를 측정하였다.

**Ribosomal Ribonuclease**의 분리

Harder 등 (1980)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다(Table 1).

Fraction 3에 10 mM 농도가 되도록 EDTA를 처리하여 35°C에서 45 분간 incubation시킨 후 30,000×g에서 15 분간 원심 분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate로 80% 포화시켜 다시 30,000×g에서 15 분간 원심 분리하여 pellet을 취한 후 buffer(B) (30 mM Tris-HCl, pH 7.5/5% glycerol/10 mM 2-mercaptoethanol)로 희석하고 rRNase의 효소액으로 사용하기 위해 동일한 buffer 내에서 투석막(cellulose membrane, Union Carbide Co.)을 이용하여 12 시간 투석시켰다.

**Ribonuclease Assay**

기질로서 RNA(Sigma, type IV)를 증류수 1 ml에 4 mg 농도로 희석하여 사용하였다.

40 μl의 4 mg RNA/ml을 넣고 buffer(C) (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM 2-mercaptoethanol) 160 μl, 효소 분획구 40 μl을 넣어서 35°C에서 30 분간 incubation한 후 25% cold perchloric acid를 100 μl 처리하여 효소 활성을 중지시켰다.

증류수 660 μl을 넣어서 최종부피가 1 ml되게 희석하여 원심 분리(5,000×g, 15 분) 한 후 acid soluble nucleotide의 양을 260 nm에서 조사하였다.

효소의 활성을 나타내는 단위는 1 unit를 100 μmole products/min per mg protein로 정하였다.

**Thin Layer Chromatography (TLC)**

ribosomal 분획구에서 존재하는 RNase의 특성을 조사하기 위해 효소 반응 후 생긴 생성물을 Silica GF<sub>254</sub>와 polyethylenimine (PEI)—cellulose chromatography 적용하였다.

기질로써 poly(cytidylic acid)를 증류수 1 ml에 4 mg 희석하여 사용하였으며 standard substance인 3'-CMP (Sigma)와 5'-CMP(Sigma)는 10 mM 농도를 사용하였다.

100 μl rRNase 효소 추출액에 40 μl poly(C)를 넣어서 35°C에서 19 시간 incubation한 후 10 μl의 1 M acetic acid를 첨가하였다.

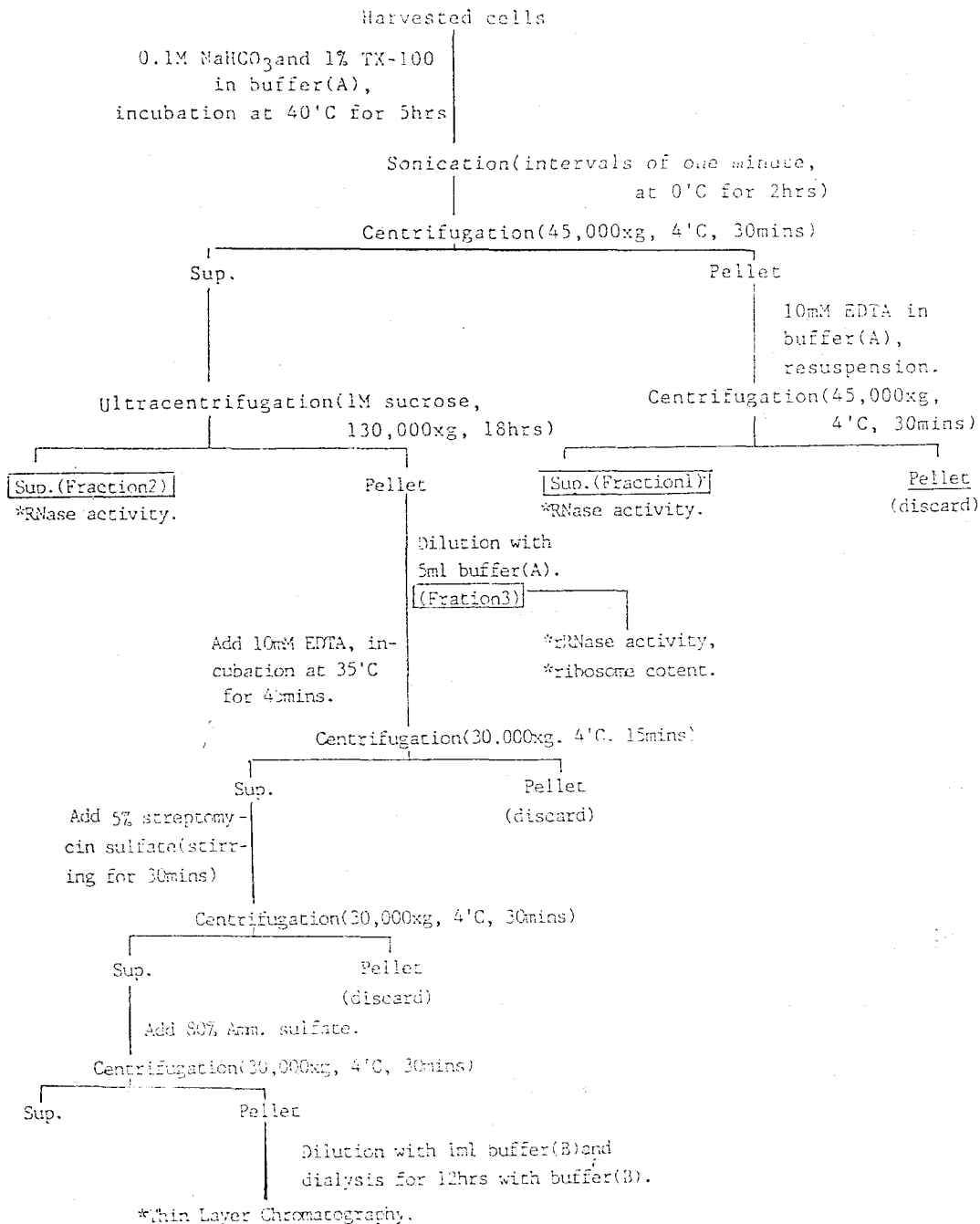
6,000×g에서 15 분간 원심 분리하여 상등액을 TLC 용 시료로 사용하였다.

Silica GF<sub>254</sub> chromatography의 전개 용매는 Mangold (1969)의 방법에 따라 n-butanol: acetone: acetate: 5% NH<sub>4</sub>OH: D,H<sub>2</sub>O=35:25:15:15:10 (v/v)으로 조정된 용액을 사용하였다.

PEI-cellulose chromatography는 Harder(1983)의 방법에 따라 증류수로 1 cm, 1 M acetate로 4 cm, 0.3 M LiCl로 8 cm salt gradient에 의하여 전개하였다.

전개가 끝난 TLC판은 실온에서 건조시킨 후 polaroid

**Table I.** Flow chart for separation of ribosomal and subcellular fractions and rRNase preparation from *Saccharomyces uvarum*.



camera를 사용하여 촬영하였다.

TLC scanning(Shimazu, CS-920)은 278 nm에서 하였다.

결 과

RNase의 활성도 변화

세 분획구에서 RNase 활성도를 측정된 결과 Fraction 1과 Fraction 2에 존재하는 RNase 활성도는 배양시기가 경과 하거나 sugar starvation 시켰을 때 유의한 증감을 보이지 않았으나 Fraction 3에 존재하는 RNase의 활성도는 정체기 특히 sugar starvation시기에 각각 2배, 10배 이상의 급격한 증가를 나타내었다(Table II).

Table II. Specific activity of ribonuclease of each fraction during growth phase and sugar starvation.

Fraction Group	Fraction 1(U)	Fraction 2(U)	Fraction 3(U)
Con	1.93±0.61	3.95±0.27	2.47±0.61
YE(E)	4.19±0.22	4.63±0.66	2.06±0.29
YE(S)	3.02±0.16	3.50±0.50	5.73±0.31
S <sup>-</sup> (3)	5.52±0.67	4.20±0.94	7.20±0.03
S <sup>-</sup> (6)	4.85±0.44	4.77±0.95	20.41±0.42

1 U (unit)=100 μmole products/min per mg protein. Con: control, YE(E): early log phase, YE(S): stationary phase, S<sup>-</sup>(3): sugar starvation during 3 hrs, S<sup>-</sup>(6): sugar starvation during 6 hrs, Fraction 1: 45,000xg pellet fraction, Fraction 2: post ribosomal fraction, Fraction 3: ribosomal fraction.

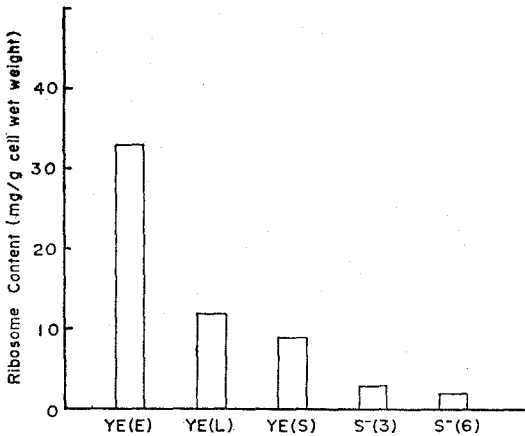


Fig. 1. Ribosome content isolated from cells during glucose starvation and growth phase. 11Ab<sub>260</sub>≐1mg, YE(E):early log phase, YE(L): late log phase, YE(S): stationary phase, S<sup>-</sup>(3): sugar starvation during 3 hrs, S<sup>-</sup>(6): sugar starvation during 6 hrs.

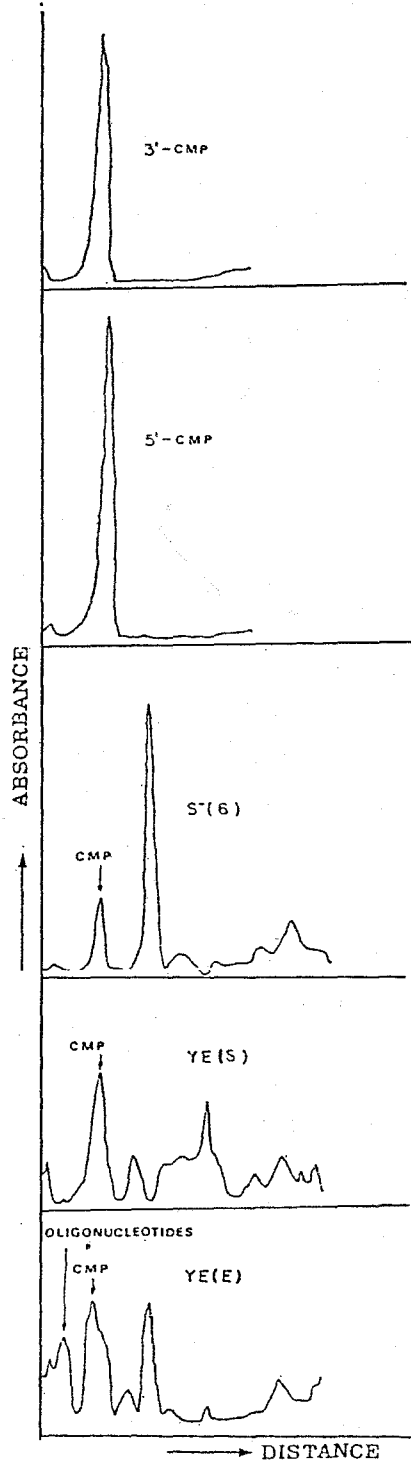
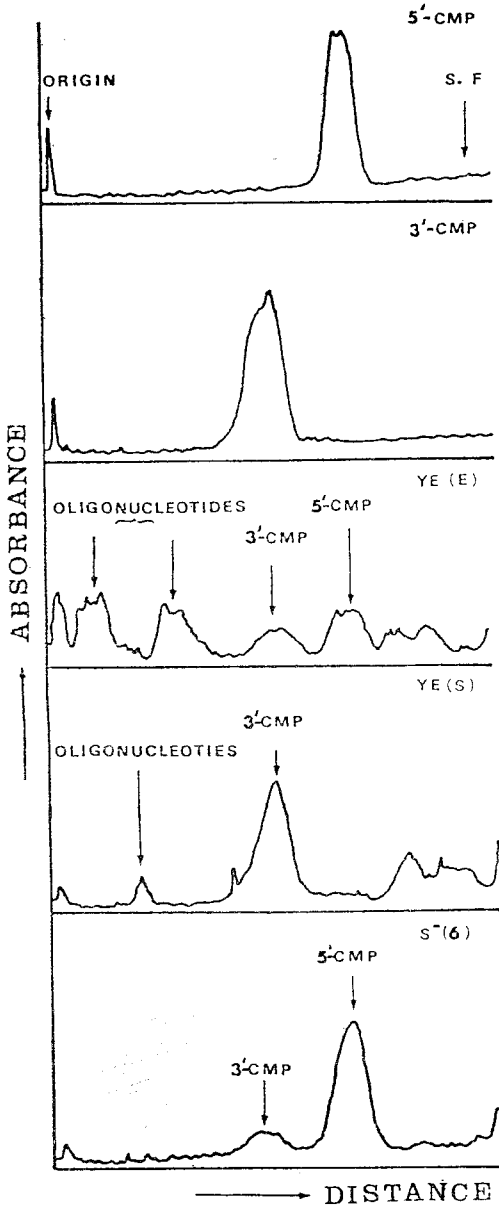


Fig. 2. Scanning profile of TLC (silica GF<sub>254</sub>) end products after enzyme reaction.

**Table III.** Extraction steps of ribosomal RNase.

Fraction	Total protein(mg)	Total activity	Specific activity	Yield (%)
Suspension of ribosomes	60.00	52.86±2.78	0.88±0.46	100
EDTA and streptomycin sulfate	15.75	31.99±4.17	2.03±0.26	60
Ammonium sulfate	3.00	13.91±0.66	4.36±0.22	26



**Fig. 3.** Scanning profile of TLC (PEI-Cellulose) end products after enzyme reaction. S.F: solvent front.

**Ribosome 양의 결정**

YE(E)에서는 많은 양의 ribosome이 나타났으나, YE(L)나 YE(S)로 감에 따라 그리고 sugar를 주지 않았을 경우에 1/3~1/6까지 급격히 감소하였다(Fig. 1).

**Ribosomal RNase의 추출**

염색에 의하여 부분 정제되면서 추출된 rRNase는 EDTA와 streptomycin sulfate 단계를 거칠 때 약 2.5 배 정제되었고 수율은 60%였다. 그리고 ammonium sulfate precipitation 과정까지 약 5 배 정도의 정제 효과를 나타냈으며 26%의 수율을 보였다(Table III).

**Thin Layer Chromatography에 의한 생성물의 검출**

ribosome에 존재하는 rRNase의 가수분해 특성을 살펴보기 위해 염색에 의해 정제된 효소 추출액과 기질로써 poly(C)를 반응시켜서 TLC 방법에 의하여 생성물을 분석한 결과는 다음과 같다.

Silica GF<sub>254</sub> chromatography를 한 결과 YE(E)에서는 oligonucleotide와 CMP가 나타났으며 YE(S), S<sup>-</sup>(6)에서는 oligonucleotide가 출현하지 않았고 CMP만 나타났다. 그리고 공통적으로 Y(E), YE(S), S<sup>-</sup>(6)에서 nucleotide, free base로 추정되는 다른 생성물도 나타났다(Figure 2).

3'-CMP와 5'-CMP를 구분하기 위하여 PEI-cellulose chromatography를 시행하였다. 결과 YE(E)에서는 oligonucleotide와 3'-CMP, 5'-CMP, YE(S)에서는 oligonucleotide와 3'-CMP가 검출되었고 YE(E)에 비해 YE(S)에서는 3'-CMP의 양이 많았다. S<sup>-</sup>(6)에서는 3'-CMP와 5'-CMP가 나타났으며 YE(E)에 비해 5'-CMP의 양이 많았다(Figure 3).

**고 찰**

이상에서 본 결과 stationary phase나 sugar starvation 시기에 rRNase 활성도가 증가되는 현상과 ribosome 양의 감소를 연관시켜 볼 수 있는데, 배양시기가 경과함에 따라 rRNase의 활성도 증가는 RNA의 양을 감소시킬 뿐 아니라 ribosome의 stability도 감소시킨다는

Swida and Harder (1981)의 보고와도 유관하다.

이는 결국 새로운 환경에 적응하기 위한 현상으로 RNA와 ribosome을 분해 하여 이들 산물을 reutilization 하기 위한 nucleotide의 Salvage pathway가 switch on 되었기 때문에 사라진다. *E. coli*를 사용하여 RNA 분해능과 starvation시 생존률을 비교한 Kaplan and Apirion (1975)의 연구 결과로 미루어 보아 RNA 분해 현상은 역시 생물학적으로 중요하다는 것이 인식되어 졌다.

TLC의 결과 YE(S)에서는 oligonuclease와 3'-ribonuclease가 나타났으나 5'-ribonuclease는 나타나지 않았고 S-(6)에서는 5'-ribonuclease, 3'-ribonuclease가 나타났으나 oligonuclease는 검출되지 않았다. YE(S)에서는 3'-ribonuclease, 5'-ribonuclease, oligonuclease가 나타났다.

Swida and Harder (1981)가 연구한 결과로는 효모 세포(*S. cerevisiae*)에서 sugar starvation 시켰을 때 rRNase의 활성도가 증가하며 이때는 latent한 2종류의 RNase가 나타나는데 3'-ribonuclease는 late log phase 나 stationary phase 그리고 sugar starvation 시켰을 때 나타나며 5'-ribonuclease는 배양 시기나 nutrient의 down-shift에 상관없이 나타난다고 보고하였다.

즉 *S. uvarum*에서는 *S. cerevisiae*에서와는 달리 3'-ribonuclease와 5'-ribonuclease가 nutrient의 down-shift와는 상관없이 존재하며 환경조건에 따라 특정 효소의 활성도가 증가한다는 것을 알 수 있었다. YE(S)에서는 3'-ribonuclease의 활성도만이 증가하였고, S-(6)에서는 5'-ribonuclease의 활성도가 증가하는데 왜 자기 다른 효소의 활성도가 증가하는지는 더 연구되어야 할 것이다. 즉 세포 내부 혹은 외부의 metabolic stress(sugar, base starvation, 혹은 sugar나 base의 종류에 따른 starvation)에 대한 두 효소의 induction mechanism이 다르기 때문인지, 혹은 세포 내, 외부의 어떤 요인에 의하여 효소의 modification이 일어나므로써 이미 존재하던 두 효소의 기능적인 활성부위가 불활성 또는 활성화되기 때문인 지는 더 연구해야 될 것으로 생각된다.

Silica GF<sub>254</sub> chromatography에서는 동정되지 않은 생성물이 나타났는데 이는 nucleoside나 base로 생각되며 ribosome에서도 3'-ribonuclease나 5'-ribonuclease의 에도 다른 효소가 binding되어 있다는 것을 가정해 볼 수 있다.

## 적 요

효모 세포(*S. uvarum*)를 재료로 하여 배양 시기 및 sugar starvation시기에 특이하게 출현 또는 유도되는 RNase의 localization과 특성을 조사하고자 하였다.

정상 배양 시기 및 sugar starvation시킨 효모 세포를 세포 분획구에 따라 RNase 활성도를 측정하는 한편 ribosome 양의 변화를 조사하였다. 특히 ribosomal 분획구에서 추출한 RNase들을 poly(C)와 반응시킨 후 생성물을 TLC에 적용하여 효소의 특성 및 유도 여부를 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

세포 분획구 중 45,000×g pellet 분획구 및 post ribosomal 분획구에서는 배양 시기나 sugar starvation에 관계없이 RNase의 활성도는 유의하게 증감하지 않았으나, ribosomal 분획구에서는 정체기와 sugar starvation시 활성도가 각각 2배, 10 배 이상 급격히 증가하였다.

ribosome의 양적 동태를 살펴보면 early log phase의 세포에 비하여, 정체기 세포와 sugar starvation시킨 세포에서는 1/3~1/6까지 급격히 감소하였다.

TLC의 결과 rRNase의 종류는 early log phase에서는 oligonuclease와 3'-ribonuclease, 5'-ribonuclease, stationary phase에서는 oligonuclease, 3'-ribonuclease, sugar starvation 시켰을 때는 3'-ribonuclease, 5'-ribonuclease의 활성이 나타났다. 그리고 완전 배지를 사용한 효모 세포에서는 공통적으로 oligonuclease의 활성이 나타난 반면, sugar starvation시킨 효모 세포에서는 oligonuclease의 활성은 나타나지 않았다.

## 문 헌

- Altman, S.E., Bowman, J., Garber, R.L., Koll, T., Koski, R.A., and Stark, B.C. (1980): Aspects of RNase P structure and function in tRNA; biological aspects, Cold Spring Harbor Lab., New York, p. 71.
- Altman, S., Guerrier-Takata, C., Frankfort, H.M. and Robertson, H.D. (1982): RNA processing nuclease; Nucleases, Cold Spring Harbor Lab., New York, p. 243-274.
- Cohen, L. and Kaplan, R. (1977): Accumulation of nucleotides by starved *E. coli* cells as a prob for the involvement of ribonuclease in ribonucleic acid degradation. *J. Bacteriol.* 129: 651-657.

- Dhariwal, K.R., Vasantha, N., Erwt and Freese (1982): Partial nucleotide limitation induces phosphodiesterase I and 5'-nucleotidase in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**: 1146-1149.
- Harder, B.S. (1983): Heat shock induction of ribonuclease in *S. cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **17**: 23-26.
- Harst, E. (1982): Ribonuclease P in ribonuclease, p. 246-248.
- Kaplan, R. and Apirion, D. (1975a): The fate of ribosomes in *E. coli* cells starved for a carbon source. *J. Biol. Chem.* **250**: 1854-1863.
- Kaplan, R. and Apirion. (1975b): Decay of ribosomal ribonucleic acid in *E. coli* cells starved for various nutrients. *J. Biol. Chem.* **250**: 3174-4178.
- Kudrna, R. and Edilin, G. (1975): Nucleotide pools and regulation of ribonucleic acid synthesis in yeast. *J. Bacteriol.* **120**: 740-742.
- Mangold, H.K. (1969): Nucleic acids and nucleotides: *Thin Layer Chromatography*, Berlin Heidelberg, New York, p786-804.
- Niyogi, S.K. and Datta, A.K. (1975): A novel oligoribonuclease of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **18**:7307-7312.
- Nossal, N.G. and Singer, M.F. (1968): The processive degradation of individual polyribonucleotide chains I. *E. coli* ribonuclease II. *J. Biol. Chem.* **243**: 913-922.
- Schulz-Harder, B., Swida, U. and Käufer, N. (1980): A ribonuclease from yeast associated with the 40S ribosomal subunit. *Biochem. Biophys. Acta* **565**: 173-182.
- Spahr, P.F. and Hollingworth, B.R. (1961): Purification and mechanism of action of ribonuclease from *E. coli* ribosome. *J. Biol. Chem.* **236**:823-831.
- Swida, U. and Harder B.S. (1981): The occurrence of two ribosomal ribonuclease depending on growth phase in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* **652**: 129-138.
- Villadsen, I. and Michelsen, O. (1977): Regulation of PRPP and nucleoside tri and tetraphosphate pools in *E. coli* under conditions of nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* **130**:136-143.

<Received June 1, 1986; Accepted July 3, 1986>