Journal of the Korean Chemical Society
1997, *Vol. 41, No. 7*
Printed in the Republic of Korea

초청총설논문

*Pseudomonadaceae*의 5S rRNA의 구조와 기능

高文珠[†] · 趙峯來[†] · 金尙範 · 李永勳[§] · 朴仁源*
서울대학교 자연과학대학 화학과
[†]조선대학교 자연과학대학 화학과
[†]청주대학교 이공대학 화학과
[§]한국과학기술원 화학과
(1997. 6. 10 접수)

The Structure and Function of 5S rRNAs from *Pseudomonadaceae*

Moonjoo Koh[†], Bongrae Cho[†], Sangbumn Kim, Younghoon Lee[§], and Inwon Park*
Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[†]Department of Chemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea
[†]Department of Chemistry, Chungju University, Chungju 360-764, Korea
[§]Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
(Received June 10, 1997)

요 약. 5S rRNA는 리보솜의 큰 소단위체를 이루는 한 RNA 성분이다. 1996년 9월까지 5S rRNA의 일차구조가 조사된 것으로서 BERLIN DATA BANK에 수록된 수는 1661개가 된다. 우리 연구진은 15가지의 *Pseudomonadaceae*의 5S rRNA의 일차구조, 이차구조, 고차원 구조들을 조사하였다. 5.8S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA 들과는 달리 5S rRNA에는 변형된 누클레오티드들이 거의 없다. 최근에 몇 가지 생물종들의 5S rRNA들에서 예외적으로 Ψ, hm^5C, m^3U, ac^4C, ac^4Cm 따위 변형된 누클레오시드들이 발견되었다. *Pseudomonadaceae*의 5S rRNA들은 115개에서 120개의 누클레오티드로 구성된다. 길이의 불균일성은 한편으로는 일차 전사물의 가공방식의 다양성에 기인하고 또 다른 한편으로는 86번에서 90번 까지의 e 고리 부분에서 누클레오티드의 결실이 상이하게 일어나는 데에도 기인한다. 조사한 15가지의 5S rRNA들 사이에는 일차구조의 광범위한 상동성을 볼 수 있는데, 이것은 5S rRNA가 진화적으로 잘 보존되어 있음을 반영하는 것이다. 진화과정에서 5S rRNA의 보존성은 일차구조뿐 아니라 이차구조에서도 잘 나타나 있다. 우리는 몇 가지 화학 탐침과 효소 탐침을 사용해서 조사한 결과에 근거해서 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들에 공통적으로 적용할 수 있는 이차구조의 일반모형을 제안하였는데, 그 몇 가지 특징을 보면 다음과 같다. (1) 5개의 나선 줄기와 5개의 고리로 구성된다. (2) 52번-53번 위치와 66번 위치에 내밀린 구조가 있다. (3) 여러 위치의 염기들이 보존되어 있는데, 특히 c 고리와 d 고리의 염기들의 보존도가 높다. (4) 나선 줄기에서 염기의 치환이 일어나더라도 맞은편 가닥의 상응하는 위치의 염기의 치환이 보상적으로 일어나므로 전체의 나선 줄기 구조는 보존된다. (5) 매우 두드러진 성질은 d 고리에서 많은 비표준형 염기쌍이 형성되며, 81번과 95번 사이에 비표준형 염기상 $U_{81} \cdot U_{95}$가 형성될 수 있다는 것이다. 우리의 분석결과에 따르면 용액에서 5S rRNA의 c 고리, a 고리, e 고리들이 삼차 상호작용을 할 수 있는 형태를 가지며, 이때 b-C 구역과 d 고리가 5S rRNA 분자의 접힘에서 돌쩌귀의 구실을 하는 것으로 추측한다. 5S rRNA의 고차원 구조에 대해서 다른 연구자들이 두 모형을 제안하고 있다. 그 중 폴리폼프 모형이 우리의 분석 결과와 잘 맞는다. 그러나 오늘날 제안된 모형들만으로는 5S rRNA의 용액에서의 고차원 구조를 만족스럽게 설명할 수 없다. 5S rRNA의 일차구조들에 근거해서 재구성한 계통수는 *Pseudomonadaceae* 종들 사이의 유연관계를 이해하는데 중요한 정보를 제공해주며, 또 이것은 *Pseudomonadaceae* 종들의 체계적 분류에 유용하게 쓰일 것으로 생각한다.

ABSTRACT. 5S rRNA is an RNA component of the large subunit of a ribosome. The number of nucleotide se-

quence of 5S rRNAs recorded in BERLIN DATA BANK as of september 1996 is 1661, including 5S rRNA gene nucleotide sequences. We have studied the primary, secondary and higher order structures of fifteen 5S rRNAs from *Pseudomonadaceae*. In contrast to 5.8 rRNAs, 16S rRNAs and 23S rRNAs, 5S rRNAs contain modified nucleotides very rarely. Recently, several modified nucleotides, such as Ψ, hm^5C, m^3h, ac^4C and ac^4Cm were found in several species. 5S rRNAs from *Pseudomonadaceae* consist of 115 to 120 nucleotides according to species. This heterogeneity in the lengths arises in one part from the difference in the processing mode of primary transcripts, and also in other part from the difference in nucleotide deletion in loop e consisting of bases 86 through 96. There is an extensive homology of primary structure among the fifteen 5S rRNAs investigated, which reflects that 5S rRNAs are highly conserved during the evolution. We have found that not only the primary structure but also the secondary structure of 5S rRNA is highly conserved. We have proposed a generalized secondary structure model applicable universally to the 5S rRNAs from *Pseudomonadaceae* based on the analytical results obtained by using chemical and enzymatic probes. Its striking features are, (1) it consists of five stems and five loops, (2) it has two bulges at positions 52-53 and at position 66, (3) bases at some positions are conserved, especially bases in loops c and d show high degree of conservation, (4) in spite of the base substitutions in a strand of helical regions their structures are well conserved because of the compensatory base substitution in the opposite strand, (5) the most remarkable feature is that there occur many nonstandard base pairs in loop d and that an unusual base pair U81 · U85 occurs at positions 81 and 85. Our studies show that in solution 5S rRNAs form a structure in which loop c, a and e interact one another, and region b-C and loop d act as hinges in molecular folding of 5S rRNA. Two models of the higher order structure of 5S rRNA have been proposed by other research groups, of which lollipop model agrees with our data. Yet, proposed models for 5S rRNA are not perfect enough to explain satisfactorily the higher order structure of 5S rRNA. The phylogenic tree reconsistituted from the primary structures is helpful for the understanding the relatedness among the species of *Pseudomonadaceae*, and it is also useful for the systematic taxonomy of the related species.

서 론

대장균 리보솜의 큰 소단위체(50S 소단위체)에는 23S rRNA 이외에도 5S rRNA가 들어있다는 것이 처음으로 보고된 후,[1] 진핵세포, 엽록체와 미토콘드리아 따위 세포소기관들의 리보솜의 큰 소단위체에도 5S rRNA 또는 이것에 상응하는 작은 rRNA 들이 들어있다는 것이 밝혀졌다. 1996년 9월까지 조사한 5S rRNA의 종류는 1661가지가 된다.[2] 이 rRNA는 약 120개의 누클레오티드로 구성되는 작은 RNA 분자이다. 진핵생물의 리보솜의 큰 소단위체는 5.8S rRNA라는 또 하나의 작은 rRNA를 가지고 있다(**표 1** 참조).

5.8S rRNA의 염기 순서는 박테리아의 23S rRNA의 5′ 말단 부분의 염기 순서와 상동성이 매우 크다.[3,4]

표 1. 리보솜의 두 소단위체들에 있는 rRNA들

	세균	엽록체	진핵생물
큰 소단위체	23S	23S	28S
	5S	4.5S	5S
			5.8S
작은 소단위체	16S	16S	18S

단백질 생합성에서 23S rRNA와 16S rRNA가 하는 역할에 관해서는 최근에 와서 조금씩 알려지기 시작하였지만 5S rRNA와 5.8S rRNA와 같은 작은 rRNA들이 리보솜에서 무슨 역할을 하는지에 관해서는 아직 확실히 알려진 것이 거의 없다. 이 글에서는 우리 연구진과 다른 연구자들이 조사한 *Pseudomonas*와 *Xanthomonas*를 포함한 15가지의 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들의 구조와 특성을 다루고 그 밖의 5S rRNA들과 비교하고자 한다.

Pseudomonadaceae 5S rRNA들의 조성과 일차구조

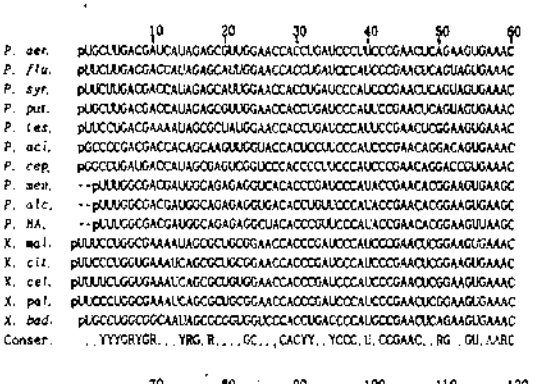
조성. 대부분의 5S rRNA는 AMP, GMP, CMP, UMP 따위 변형되지 않은 네 가지의 주된 누클레오티드들로 이루어지는 것이 보통이지만, 약간의 생물종의 5S rRNA들에서 변형된 누클레오시드들이 드물게 발견된다. 효모와 *Euglena*의 5S rRNA에 수도우리딘(Ψ)이 있는 것이 보고되었으며,[5] pH 1과 85 °C의 극한조건에서 자라는 *Sulfolobus acidocaldarius*라는 고대박테리아의 5S rRNA에 5-히드록시메틸시티딘(hm^5C)과 N^3-메틸우리딘(m^3U)이 있다는 것이 보고되

었으며,[6] 최근에는 110°C에서 자라는 *Pyrodictium occultum*이라는 고대박테리아의 5S rRNA에서 N^4-아세틸시티딘(ac^4C)과 2′-O-메틸-Na^4-아세틸시티딘(ac^4Cm)이 발견되었다.[7] 오늘날까지 조사한 15가지의 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들에서는 변형된 누클레오시드가 하나도 발견되지 않았다. 5S rRNA들에서 발견된 변형된 누클레오시드들이 리보솜의 기능에서 무슨 역할을 하는지에 관해서는 알려진 것이 전혀 없다. 5S rRNA들과는 달라서 16S rRNA와 23 rRNA는 변형된 누클레오시드들(주로 메틸화된 누클레오시드들)이 20가지 이상이 알려져 있으며 그들은 거의 모든 생물종들에 널리 존재한다.[8] 이 두 RNA의 경우에 변형된 누클레오시드들의 기능이 일부 알려져 있다. 예를 들면, 대장균의 16S rRNA의 어떤 위치의 아데닌 염기들의 메틸화는 대장균에 카나마이신과 카수가마이신에 대한 저항성을 가지게 한다.

일차구조들의 상동성. 1960년대까지는 지문법과 같은 번거로운 방법으로 5S rRNA의 일차구조를 결정하였다.[9] 그러나 1970년대 말경에 개발된 효소법[10,11]과 화학법[12]으로 5S rRNA의 일차구조의 결정이 훨씬 더 수월해졌다. 1996년 9월까지 일차구조가 결정된 5S rRNA와 5S rRNA의 유전자들 수는 진핵생물의 것 430개, 진성박테리아의 것 449개, 고대박테리아의 것 54개, plastid의 것 34개, 미토콘드리아의 것 9개 등 모두 1661개가 있고, 그 일차구조들이 BERLIN DATA BANK에 수록되어 있다. 여기에다 우리 연구진이 결정한 12개의[13] *Pseudomonadaceae*의 것들을 합치면 모두 1673개의 5S rRNA의 일차구조가 알려져 있다. 박테리아 5S rRNA의 길이는 일반적으로 120개의 누클레오티드로 이루어지지만, 우리가 조사한 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들은 120개 보다 적은 누클레오티드들로 이루어지는 것들이 많이 있다(**표 2** 참조).

표 2. *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들의 길이의 불균일성

5S rRNA를 추출한 균주	누클레오티드 수
P. aeruginosa[14], *P. fluorescens*[14] *P. syringe*[15], *P. putida*[16] *X. campestris pv. badrii*[17]	120
X. maltophilia[18], *X. campestris pv. citri*[19], *X. campestris pv. celebensis*[20], *X. campestris pv. palargonii*[17]	119
P. mendocina[21]	117
P. testosteroni[22], *P. cepacia*[23] *P. MA*[24]	116
P. alcaligenes[25], *P. acidovorans*[26]	115



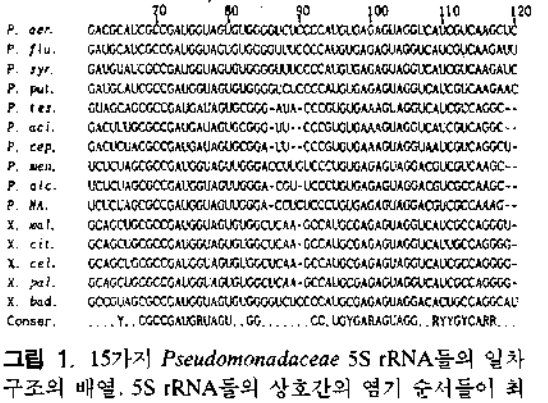


그림 1. 15가지 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들의 일차구조의 배열. 5S rRNA들의 상호간의 염기 순서들이 최대한으로 합치하도록 배열하였다. 5′과 3′ 말단들, 그리고 분자 내부에서 염기의 결실이 일어나는 자리들을 하이픈으로 나타내었다13. R와 Y는 각각 푸린 염기와 피리미딘 염기를 가리킨다. 박테리아 이름들의 약자는 아래와 같다. *P. aer., P. aeruginosa; P. flu., P. fluorescens; P. syr., P. syringe; P. put., P. putida; P. tes., P. testosteroni; P. aci., P. acidovorans; P. cep., P. cepacia; P. men., P. mendocina; P. alc., P. alcaligenes; P. MA, P. MA; X. mal., X. maltophilia; X. cit., X. campestris pv. citri; X. cel., X. campestris pv. celebensis; X. pal., X. campestris pv. palargonii; X. bad., X. campestris pv. badrii.*

5S rRNA들의 길이의 불균일성은 두 가지 이유로 일어난다. 첫째는 5S rRNA 선구체가 5′과 3′ 말단에서 가공될 때 절단이 다양하게 일어나기 때문이고, 둘째 는 5S rRNA의 염기 번호 86에서 90까지의 부분에서 균주에 따라 누클레오티드의 결실이 다르게 일어나기 때문이다(**그림 1** 참조). 뒤에서 다시 기

술하게 되겠지만 이 부분은 5S rRNA의 이차구조에서 e 고리에 해당하는 부분이며, e 고리의 크기가 균주에 따라 다른 이유가 된다.

그림 1은 15가지 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들의 일차구조들을 상호간의 염기 순서가 최대한으로 합치되게끔 배열한 것이다. 거의 모든 5S rRNA들에서 보존되어 있는 $U_{35}CCCAU_{40}$, $C_{42}CGAAC_{47}$, G_{72}-$AUGRUA_{78}$, $G_{98}ARAGUA_{104}$들과 같은 연속부분들을 일차구조가 최대한으로 합치하게 배열할 때 지표로 삼았다. 이 그림에서는 앞에서 이미 기술한 바와 같이, 5S rRNA의 5′과 3′ 말단에서 어떤 경우에는 결실이 일어나고 어떤 경우에는 5′ 말단에서 가외의 누클레오티드 한 개가 더 있는 것을 볼 수 있다. 예를 들면 *X. maltophilia, X. campestris pv. celebensis, X. campestris pv. palargonii*의 5S rRNA들이 5′ 말단에서 가외의 누클레오티드를 가지고 있는데 반해서 *P. mendocina, P. alcaligenes, P. MA*의 5S rRNA들은 한 개의 누클레오타드가 결실되어 있다.

그림 1의 배열에서 맨 아래줄은 5S rRNA들의 일차구조의 같은 위치에서 염기들이 보존되어 있는지 아닌지를 나타낸 것이다. 120개의 염기들 중 완전히 보존된 것은 54개, 푸린 → 푸린 전환(예, A → G 또는 G → A)과 피리미딘 → 피리미딘 전환(예, C → U 또는 U → C)으로 반보존된 염기수가 각각 11개와 13개로 모두 78개의 염기가 보존되어 있는데, 이것은 전체 길이의 65%에 해당한다. 이 중 푸린 염기가 43개로 전체의 36%이고, 피리미딘 염기가 35개로 전체의 28%이다. 이것은 5S rRNA의 일차구조의 많은 부분들이 염기 순서 상으로도 많이 보존되어 있음을 반영하는 것이다.

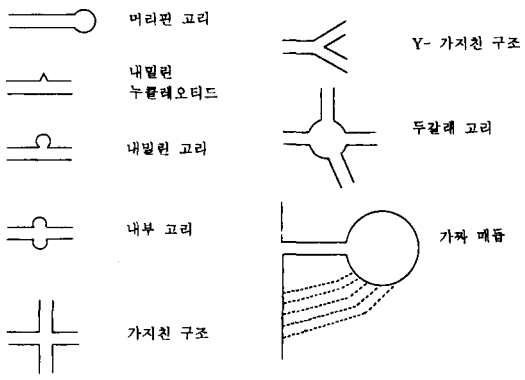


그림 2. 5S rRNA에서 흔히 볼 수 있는 이차구조들. 이중나선 부분들을 평행선으로 나타내었고, 가짜매듭(pseu-doknot)의 염기쌍들을 절선으로 표시하였다.

Pseudomonadaceae 5S rRNA의 이차구조

자유에너지 최소화법에 의한 이차구조 예견법. 모든 RNA 분자들에서 대부분의 누클레오티드 잔기들은 서로 작용하여 분자 내에서 짧은 이중나선 부분과 짝을 짓지 않은 고리 부분을 이루면서 이른바 이차구조를 구성하는 것이 잘 알려져 있다.[27] 5S rRNA들의 이차구조에서 흔히 볼 수 있는 구조 요소들에는 **그림 2**에 나타낸 형태의 것들이 있다.

RNA의 이차구조를 결정하는 데 세 가지 방법이 사용되고 있다. 첫째는 열역학 변수들을 사용하여 RNA의 일차구조의 정보에서 이차구조를 예견하는 방법인데, 이 방법은 Tinoco 등[28]이 처음으로 개발하여 사용하였다. 이 자유에너지 최소화법은 분자 내에서 최대한의 염기 짝짓기를 허용함으로써 열역학적으로 가능한 안정한 구조를 예견할 수 있다. 또한 최근에는, 머리핀 고리와 내부 고리의 안정성에 대해서 주변의 염기 짝짓기, 고리의 염기 순서, 고리의 길이들 또는 삼차 상호작용이 이차구조의 안정성에 미치는 영향을 고려하여 개발한 접히기 알고리즘[29-31]이 좀 더 정확한 RNA의 이차구조 예견에 사용되고 있다. 두번째는 5S rRNA의 일차구조에서 유도하는 계통발생학적 유연관계를 반영하는 구조 요소들을 이차구조 형성의 제한 조건으로 삼아서 5S rRNA들의 이차구조를 예견하는 방법이다. Fox와 Woese[32]가 이러한 방법으로 박테리아 5S rRNA들이 이차구조를 이룬다는 것을 처음으로 제안하였다. 계통발생학적 분석은 이차구조를 예견하는 매우 정확한 방법이다. 이 분석법은 유사한 기능을 가지는 RNA들은 공통의 구조 요소들을 가질 것이라는 가정에 근거한 것이다. 가령 앞에서 언급한 $U_{35}CCCAU_{40}$, $C_{42}CGAAC_{47}$, $G_{72}AUGRUA_{78}$ 따위 연속 부분들이 거의 모든 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들의 일정한 자리에서 보존되어 있다는 사실과 이중나선 줄기의 여러 위치들에서 염기쌍들이 보상적으로 바뀌는 사실(예 ; G · C → C · G, A · U → U · A, 또는 G · C → A · U, C · G → U · A 따위 변이)은 5S rRNA들의 공통의 구조 요소로 볼 수 있다.

실험 결과를 근거로 하는 RNA의 이차구조 분석법. RNA의 이차구조를 분석하는 세번째 방법은 실

험결과에 근거를 두는 것이다. 컴퓨터 프로그램에만 의존하고서는 삼차 상호작용이나 주변의 구조 요소들에서 받는 영향을 정확하게 계산할 수 없다. 용액에 있는 RNA의 이차구조를 분석하는 가장 신빙성이 큰 방법은 효소 탐침들과 화학 탐침들을 사용하는 방법이다. 효소 탐침들을 사용하는 방법에서는 특정한 효소가 염기 짝짓기를 한 이중나선의 일정한 위치를 선택적으로 절단하는 특이성을 이용하는 것과 짝을 짓지 않은 단일가닥 부분을 염기에 특이하게 또는 염기에 대한 특이성 없이 절단하는 성질을 이용하는 것이 있다. 그리고 화학 탐침을 사용하는 실험에서는 탐침으로 RNA를 처리한 후 (1) 사슬의 절단이 일어날 수 있는지 없는지, (2) 시발물질의 연장법으로 변형된 염기 또는 인산의 위치를 검출할 수 있는지 없는지에 따라서 탐침을 선택한다. 5S rRNA의 이차구조 분석에 흔히 사용되는 탐침들을 그들의 분자량과 표적이 되는 자리들과 함께 표 3에 나타내었다. 일반적으로 실제의 분석 실험들은 되도록 여러가지 다른 조건들에서 실행해서 결과들을 서로 비교하여야 한다. 즉 자연조건(Mg^{2+}과 Na^{+}이 있고 온도가 낮은 조건), 반변성 조건(EDTA가 있고 온도가 낮은 조건), 변성 조건(EDTA가 있고 온도가 높은 조건) 따위 다양한 조건들에서 분석해야만 나선구조들의 안정도를 짐작할 수 있다. 반변성 조건에서는 불안정한 삼차 상호작용들과 비표준형 상호작용들이 풀어질 것이다.

표 3. 이차구조 분석에서 사용하는 효소 탐침들과 화학 탐침들

탐 침	분자량	특이성	검출법* A	검출법* B
RNase T1	11,000	단일가닥의 G	+	+
RNase U2	12,400	단일가닥의 A>G	+	+
nuclease S1	32,000	단일가닥의 N†	+	+
RNase V1	15,900	짝을 지었거나 치쌓인 N	+	+
DMS	126	N3-C	s	+
		N1-A	-	+
		M7-G	s	s
DEPC	174	N3-A	-	+
		N1-G	-	+
CMCT	424	N3-U	-	+
		N1-G	-	+
kethoxal	148	N1-G, N2-G	-	+
bisulfite	104	단일가닥의 C>U	s	s
ENU	117	인산	s	s
EDTA-Fe(II)	346	용매가 접근할 수 있는 지역에 있는 N†	s	s
MPE-Fe(II)	780	짝을 지은 N†	s	s

*RNA 가닥의 절단과 변형 위치들을 검출하는 방법들은 다음과 같다. (A)는 말단을 ^{32}P로 표지한 RNA 분자를 가지고 검출할 수 있는 경우이고, (B)는 시발물질 연장법으로 검출할 수 있는 경우이다. (+)는 해당하는 검출법을 사용할 수 있다는 것을 가리키고, (-)는 해당하는 방법을 사용할 수 없다는 것을 가리키고, (s)는 리보오스-인산 사슬을 절단하려면 화학처리가 필요하다는 것을 가리킨다. DMS = 황산 이메틸, DEPC = 피로탄산 이에틸, CMCT = 술폰산 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸) 카르보디이미드 메토-*p*-톨루엔, ketoxal = *β*-에톡시-*α*-케토부티르알데히드, Fe(II)-EDTA = 에틸렌디아민테트라아세트산, MPE-Fe(II) = 메티듐프로필 에틸렌디아민테트라아세트산. †는 네 가지 누클레오티드들의 어느 것이든 해당한다는 것을 가리킨다.

핵산 가수분해 효소들은 덩치가 커서 입체 장애를 받기가 쉬운데, 특히 RNA가 다른 단백질들과 결합되어 있을 때가 그러하다. 또한 그들은 RNA의 특별한 접힘에 의해서도 입체장해를 받을 수 있다. RNase T1과 U2, 핵산 가수분해효소 S1들은 모두 밖으로 노출된 짝짓지 않은 구역들을 공격할 수 있다. RNase V1은 이중나선 구조와 염기들의 치쌓임 구조가 있는 구역을 알려주는 유용한 효소로 사용된다.

화학 탐침들은 입체 장애의 영향을 조금밖에 받지 않으므로 원자 수준까지 자세한 정보를 제공한다. 화학 탐침들의 대부분은 염기들의 특정한 위치들을 특이하게 변형시킨다. 예를 들면, 황산 이메틸(DMS)와 술폰산 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸) 카르보디이미드 메토-*p*-톨루엔(CMCT)를 사용하면 네 가지 염기의 하나하나에서 왓슨-크리크 짝짓기에 관여하는 위치를 알아볼 수 있다(표 3 참조). *β*-에톡시-*α*-케토부티르알데히드(Kethoxal)은 짝짓지 않은 구아닌들을 분석할 수 있다. 구아닌과 아데닌의 N7 위치가 각각 DMS와 DEPC에 대해서 반응성을 나타내지 않으면 이 염기들이 비표준형 염기 짝짓기를 하고 있거나 염기 치쌓임에 관여하고 있다는 것을 의미한다. 에틸 니트로소 우레아(ENU)는 N-니트로소 알킬화제인데, 이 시약은 그 밖의 알킬화제가 주로 염기의 고리의 질소를 알킬화하는 것과는 달리 인산의 산소 원자들에 대해서 반응성을 가지고 있다. RNA의 경우에는 ENU의 반응으로 생기는 포스포디에스테

르들은 불안정하기 때문에 약한 알칼리 처리로 쉽게 쪼개진다. ENU는 다른 화학 탐침들과 달라서 일차구조나 이차구조에 무관하게 작용한다. 그러므로 ENU는 수소결합이나 양이온과의 결합에 관여하지 않은 인산기들을 분석하는 특이한 탐침으로 사용된다.

위에서 기술한 효소 탐침들과 화학 탐침들은 5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA 들의 이차구조 결정에 이용될 뿐 아니라 삼차구조, 즉 형태의 분석에도 널리 사용되고 있다.[33~35] 이러한 탐침들로 우리 연구진은 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들을 구조를 결정하였다. 최근에 우리 연구진은 이러한 탐침들 이외에 헥사플루오로인산(η^6-메시틸렌) 망간 트리카르보닐을 5S rRNA의 삼차구조 결정에 이용하였다.[36] 이 문제에 관해서는 IV절에서 기술할 것이다.

이전에 제안된 이차구조 모형들. 1970년대 초까지 알려진 10 가지 5S rRNA들의 일차구조를 비교분석하여 Fox와 Woese[32]가 박테리아 5S rRNA들에 대한 이차구조 모형을 처음으로 제안한 데 이어 여러 연구자들이 몇 가지 모형을 제안하였다(**그림 3**). Fox와 Woese[32] 그리고 Osawa와 Hori[37]가 제안한 이차구조의 모형은 네 개의 이중나선 줄기들과 네 개의 고리들로 이루어져 있다(**그림 3**의 a와 b), 이와 비슷한 모형에는 Pieler와 Erdmann[41]이 제안한 것이 있는데 네 개의 이중나선 줄기들과 네 개의 고리들을 가진 것은 초기의 다른 모형들과 비슷하지만, A, B, C 줄기들에 내밀린 구조(bulge)가 있는 것과 a 고리와 c 고리가 삼차 상호작용을 한다는 것이 다르다(**그림 3**의 f 참조). 그 밖의 연구진들이 최근에 제안한 모형들은 이중나선 줄기들의 길이와 고리들의 크기가 다소 다르기는 하지만 모두 다섯 개의 이중나선 줄기들과 다섯 개의 고리들로 이루어지고, B 줄기에 한 개의 염기로 된 내밀린 구조가 있고 C 줄기에 두 개의 염기로 된 내밀린 구조가 있는 점이 유사하다. *Torulopsis*의 5S rRNA만은 E 줄기에 한 개의 염기로 된 내밀린 구조를 가지고 있는 것이 특징이다.

***Pseudomonadaceae* 5S rRNA들에 대해서 제안된 새 이차구조 모형.** 우리 연구진은 지금까지 15가지의 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들을 조사한 결과에 기초해서 수 년 전에 제안한 이차구조 모형[43]을 보완 수정하여 새 모형을 제안하였는데,[44] 이 이차구조의 주요한 구조 요소들의 특징들을 아래에 기술하였다

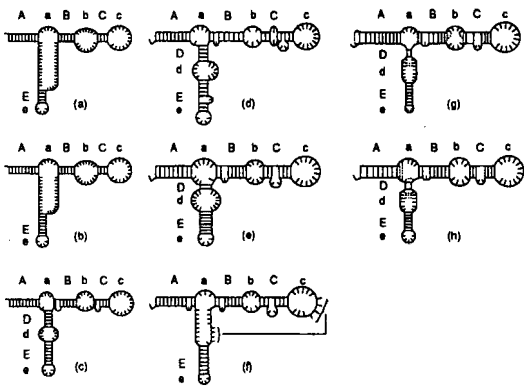


그림 3. 박테리아 5S rRNA들에 대해서 제안된 몇 가지 이차구조 모형들. (a) 그람 양성 박테리아의 5S rRNA에 대한 Fox와 Woese[32] 그리고 Osawa와 Hori[37]의 모형; (b) 그람 음성 박테리아의 5S rRNA에 대한 Osawa와 Hori[37]의 모형; (c) *Micrococcus lysodeikticus* 5S rRNA에 대한 De Wachter 연구진[38]의 모형; (d) *Torulopsis utilis* 5S rRNA에 대한 Nishikawa and Takemura[39]의 모형; (e) 대장균 5S rRNA에 대한 Studnicka[40] 연구진의 모형; (f) 대장균 5S rRNA에 대한 Pieler와 Erdmann[41]의 모형; (g) 박테리아 5S rRNA에 대한 Wolters와 Erdmann[42]의 모형; (h) *Pseudomonadaceae* 5S rRNA들에 대해서 우리 연구진이[43] 수 년전에 제안한 모형.

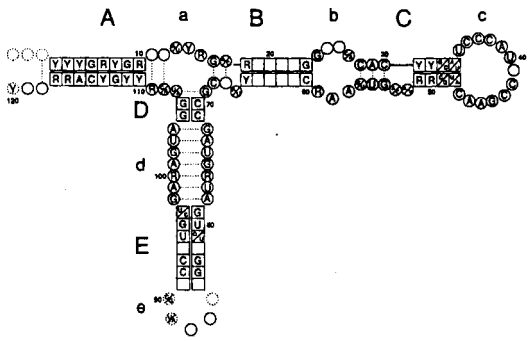


그림 4. *Pseudomonadaceae* 5S rRNA의 이차구조에 대하여 우리 연구진이 제안한 새 모형. 모형 바깥의 대문자 A, B, C, D, E들은 이중나선 구역들을 가리키고 소문자 a, b, c, d, e들은 고리들을 가리킨다. 네모는 염기쌍을 만드는 나선 구역들에 있는 누클레오티드들을 나타내고, 원은 단일가닥 구역들에 있는 누클레오티드들을 나타낸다. 점선으로 그린 원들은 누클레오티드의 결실 또는 삽입이 일어날 수 있는 위치들을 가리킨다. 한 네모 또는 원에 적힌 두 누클레오티드들은 둘 중의 어느 하나가 이 위치를 차지할 수 있음을 가리킨다. 원으로 표시한 두 누클레오티드들 사이의 점선은 염기쌍 형성이 불안정하다는 것을 가리킨다. R는 푸린 누클레오티드이고, Y는 피리미딘 누클레오티드이다.

(**그림 4** 참조).

A 줄기의 염기들은 다른 박테리아의 5S rRNA들[45]에서 처럼 비교적 잘 보존되어 있고, 이 줄기의 대부분의 결합과 염기들이 단일가닥에 특이하게 작용하는 리보핵산 가수분해효소들과 화학 탐침들의 작용을 받지 않는 것으로 보아 이 줄기는 안정한 이중나선을 이룰 것으로 생각한다. 그러나 A 줄기가 시작하는 말단 부분의 염기쌍들의 상호작용에는 상당한 유동성이 있고 a 고리에 인접한 염기쌍들도 불안정한 것으로 생각한다. a 고리에 있는 염기들이 화학 탐침들에 의한 변형과 핵산 가수분해효소 S1에 의한 공격을 받는 것으로 보아서, a 고리는 삼차원 구조에서 노출된 단일가닥으로 있는 구역이라고 생각한다. 열 가지 *Pseudomonas*종[21,22,24~26,46]과 *X. maltophilia*,[18] *X. badrii*[47]의 5S rRNA들에서 $A_{13}UR_{15}$ 연속부분이 보존되어 있는데 반해서 *X. citri, X. celebensis, X. palargonii*의 5S rRNA들에서는 $U_{13}CA_{15}$가 자리잡고 있다. Erdmann 연구진이 제안한 그 밖의 박테리아의 5S rRNA들에서는 같은 위치에 $A_{13}UA_{15}$ 연속부분이 자리잡고 있다.[45] 아마도 $A_{13}UR_{15}$ 연속부분이 이 위치에 상응하는 일반 염기 순서라고 추측된다.

B 줄기의 염기들은 가변성이 크지만 염기쌍을 이루는 염기들은 서로 보상적으로 변하기 때문에, 이 줄기는 비교적 안정하다. 이것은 리보핵산 가수분해효소 V1이 이 줄기에 강하게 작용하고 이 줄기의 염기들이 화학 탐침들로 변형되지 않는 사실로 뒷받침된다. 그러나 $G_{23} \cdot C_{60}$ 염기쌍이 *P. alcaligenes*와 *P. acidovorans*의 5S rRNA들에서는 불안정한 동요현상을 나타내는 예외가 관찰되었다.[25,26] b고리는 7개의 누클레오티드로 구성된다. 이 고리의 대부분의 염기들이 반변성된 조건 또는 37 °C 이상의 조건에서 화학변형을 쉽게 받지만, 이보다 낮은 온도나 복원된 조건 에서는 화학 변형을 받지 않는다. 이것은 이 고리가 삼차구조 형성에서 유연한 구조를 이룰 것임을 암시한다. 이 문제에 관해서는 뒤에서 기술할 삼차 상호작용에서 다시 말하고자 한다.

C 줄기는 52번과 53번 위치에 내밀린 구조 $(A/C)_{52}(A/Y)_{53}$을 가지고 있는 것이 특징이다. 이 내밀린 구조는 박테리아 5S rRNA들에 대해서 제안한 거의 모든 이차구조 모형들에서 볼 수 있다. 이 내밀린 구조를 기준으로 해서 b 고리 쪽에 있는 줄기[$C_{28}AC_{30}$ 가닥과 $G_{54}U(G/U)_{56}$ 가닥이 이루는 줄기]는 다소 불안정한 데 반해서 c 고리 쪽으로 있는 줄기[$Y_{31}Y(G/C)(A/U)_{34}$ 가닥과 $(U/A)_{48}(C/G)RR_{51}$ 가닥이 이루는 줄기]는 안정하다. b 고리쪽으로 있는 줄기의 경우 산성 조건(pH 5.5)에서는 안정화된다는 것이 관찰되었다.[20] 그러나 아직 그 이유는 밝혀져 있지 않다.

C 고리는 거의 모든 원핵생물의 5S rRNA들에서 잘 보존되어 있는 $U_{35}CCCAUN_{41}CCGAAC_{47}$ 요소를 가지고 있다. 예외적으로 *X. badrii*의 5S rRNA에서는 U_{35} 대신에 C_{35}를 가진다.[47] 또 한가지 특이한 것은 C_{37}, C_{38}, C_{43}, G_{44}, A_{45} 들이 단일가닥에 특이하게 작용하는 핵산 가수분해효소 S1의 공격을 약하게 받는 데 반해서, 이중가닥에 특이하게 작용하는 리보핵산 가수분해효소 V1의 작용을 비교적 강하게 받는다. 그리고 복원 조건에서 C_{37}, C_{38}, G_{44} 들이 화학 변형을 전혀 받지 않고 A_{45}는 약하게 받는다. 이러한 사실들은 c 고리가 5S rRNA에서 단순한 단일가닥 상태로 있지 않음을 가리키는 것이다. 아마도 c 고리의 염기들은 5S rRNA의 다른 부분과 분자 내 상호작용을 하거나, c 고리 내에서 비표준형 염기쌍을 형성하거나 염기들의 치쌓임(base stacking)으로 tetra-loop[49]와 같은 안정한 구조 요소를 이루는지도 모른다. N_{41}의 누클레오티드는 생물종에 따라 달라지는 것으로 알려져 있는데 *Psendomonas*의 경우는 *P. mendocina, P. alcaligenes, P. MA* 들의 경우의 A_{41}을 빼고는 모두 C_{41}이고, *Xanthomonas*의 경우는 *X. badrii*의 경우의 G_{41}을 빼고는 모두 C_{41}이다. 그러므로 c 고리의 일차구조의 보존성은 매우 크다는 것을 알 수 있다. D 줄기는 불안정한 $G_{69} \cdot (U/A)_{107}$과 두개의 안정한 G · C 염기쌍들로 이루어진다. $C_{70} \cdot G_{106}$ 염기쌍과 $C_{71} \cdot G_{105}$ 염기쌍이 모든 5S rRNA들에서 보존되어 있는 것이 특징이다.

D 고리는 14개의 누클레오티드들로 이루어지는데 그 중 13개가 푸린 누클레오티드이다. 이 고리는 40 °C의 비교적 높은 온도에서도 안정한 줄기를 이루고 있는 것이 특징이다.[25] 고리 내의 모든 아데닌과 구아닌 염기들은 복원조건에서는 화학 변형을 받지 않지만 2가 양이온들이 없는 반변성된 조건에서는 화학 변형을 받는 것으로 보아서 이 고리는 비교적 유연한 구조를 가지는 것이 확실하다. 최근에 우리는 메티듐프로필-EDTA-Fe(II)[MPE-Fe(II)]을 탐침으로 사용해서 d 고리의 비표준형 염기쌍들이 다소 불안정하기는 하지만 고리와 줄기가 접속하는 부분

표 4. 처음에 핵산에서 발견한 몇 가지 비표준형 상호작용들

염기-염기 상호작용	수소결합	핵산
A-U	(N7, N6)-(N3, O2)	$tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Asp}$
A-U	(N1, N6)-(N3, O2)	$tRNA^{Asp}$
A-G	(N1, N6)-(N1, O6)	$tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Asp}$
A-G	(N6)-(N7)	$tRNA^{Asp}$
G-G	(N2)-(O6)	$tRNA^{Asp}$
G-G	(N6)-(O6)	$tRNA^{Phe}$
G-G	(N1, N2)-(N7, O6)	$tRNA^{Phe}$
U-U	(N3, O4)-(O2, N3)	$tRNA^{Asp}$
		역코돈 -역코돈

들이나 b 고리와 C 줄기 사이의 세 염기쌍들 만큼 불안정하지는 않다는 것을 알았다.[50] 그림 4에 나타낸 바와 같이, 이 고리에서는 비표준형 염기쌍들이 많이 형성된다. 이러한 염기쌍들은 처음에 tRNA의 삼차구조에서 관찰되었으며(Ehresmann 등의 총설[34]을 참조하라; **표 4**), 5S rRNA들에서도 보편적으로 존재한다는 것이 알려져 있다.[51] 최근에 밝혀진 망치머리 RNA 효소의 결정체에서도 A · G 비표준형 염기쌍이 형성된다는 것이 밝혀졌다.[52] 또한 Wimberly 등은 이차원 NMR 분광법으로 두꺼비(*Xenopus*)의 5S rRNA의 d 고리(d 고리는 이 연구자들의 명명법에 따르면 E 고리에 해당함)에서 G · A 염기쌍과 역-Hoogsteen A · U 염기쌍이 형성된다는 것을 밝혔다.[53] d 고리는 이러한 비표준형 염기쌍들의 형성과 그들 사이의 염기 치쌓임 에너지로 인하여 안정화되는 것으로 생각한다. 아직 아무런 실험 증거는 얻어진 것이 없지만 우리는 d 고리의 이러한 구조적 특성이 리보솜에서 5S rRNA에게 특이한 기능을 부여할 것으로 추측한다.

E 줄기는 대부분 G · C와 G · U 염기쌍으로 이루어져 있고 리보핵산 가수분해효소 V1의 작용을 받으며, 여기에 있는 대부분의 염기들은 화학 변형을 받지 않는다. 따라서 이 줄기는 안정한 이중나선을 이룰 것으로 생각한다. *P. mendocina, P. MA, P. alcaligenes* 들의 5S rRNA들은 이 줄기에 U_{81} · U_{95} 비표준형 염기쌍을 가지고 있다. 비정상적인 염기쌍을 내포하고 있는데도 E 줄기는 상당히 안정하다. 뒤에서(V절) 기술한 바와 같이, 이 세 *Pseudomonas* 종들은 계통발생학적으로도 매우 밀접한 유연관계를 가지고 있다(**그림 7**). 이러한 사실에서 우리는 U_{81} · U_{95} 비표준형 염기쌍이 위의 세 박테리아의 5S rRNA에 일정한 기능을 가지게 하는 구조 요소가 될 것으로 추측할 수 있다. 그 밖의 박테리아에서는 E 줄기에 U · U 비표준형 염기쌍을 가진 것이 관찰된 것이 없다. 진핵생물인 두꺼비(*Xenopus*) 난자의 5S rRNA의 d 고리와 E 줄기에 각각 U_{74} · U_{101} 염기쌍과 U_{81} · U_{95} 염기쌍이 있다는 것이 알려져 있다.[34] 드문 일이기는 하지만 광범위한 생물종의 5S rRNA들의 E 줄기에서 U_{81} · U_{95} 비표준형 염기쌍이 발견된다는 것은 매우 흥미있는 일이라고 생각한다. 녹색 비황 박테리아의 한 가지인 *Herpetosiphon*의 5S rRNA에서는 E 줄기의 같은 위치에 C_{81} · C_{95} 염기쌍이 존재한다.[54] 81번과 95번 위치에 비표준형 피리미딘 염기쌍이 보존된다는 것은 기능적으로 중요한 의미를 암시하는 것으로 생각한다.

E 고리의 염기들의 보존성은 일정하지 않으며 구성 염기들의 개수도 다양하다. 그 이유는 앞에서 이미 언급한 바와 같이, 이 고리의 누클레오티드들이 결실되는 경향이 크기 때문이다. 진화적으로 매우 가까운 관계에 있는 *P. mendocina, P. MA, P. alcaligenes* 들의 5S rRNA들조차 이 고리에 각각 3개, 4개, 3개의 누클레오티드들을 가지고 있다.[21,24,25]

위에서 제시한 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA의 이차구조 모형은 Erdmann의 연구진이 제안한 모형과 비슷해서 다섯 개의 이중나선 줄기와 다섯 개의 고리를 가지고 있다(**그림 3** 참조). 그러나 줄기들과 고리들의 크기에서는 두 모형에서 다소 차이가 있다. 그것은 줄기와 고리의 접속 부분을 이루는 일부 염기쌍들을 안정한 것으로 보느냐 불안정한 것으로 보느냐에 따라서 줄기와 고리의 크기가 달라지는 데서 온다. 줄기와 고리의 접속 부분의 염기쌍들이 대부분 불안정하다는 것은 우리 연구진이 MPE-Fe(II)를 사용한 최근의 연구에 의해서도 확인되었다.[50]

5S rRNA의 고차원 구조

5S rRNA의 결정체가 얻어졌다는 보고는 벌써 오래 전에 있었지만,[55] 질 좋은 결정체가 아니었기 때문에 삼차원 구조를 결정하는 데에는 성공하지 못하였다. 최근에는 고온에서 자라는 박테리아에서 5S rRNA의 결정체를 얻었지만 역시 결정 구조의 결정은 실패하였다.[56] 그 이후로 5S rRNA의 결정 구조를

결정하였다는 보고는 아직 없다. 아마도 5S rRNA는 리보솜 단백질들과 복합체를 이루어 기능을 가지게끔 진화되어 있기 때문에 용액에서 단독으로 안정한 고차원 구조를 이루기가 어려운 본성을 가졌는지도 모른다. 할 수 없이, 5S rRNA의 고차원 구조는 화학탐침과 효소 탐침으로 수용액 상태에서의 삼차 상호작용들을 분석한 결과들을 근거로 해서 설명하는 수밖에 없다. 이 목적에 사용되는 탐침들로는 표 3에서 소개한 것들 이외에 최근에 구조-특이적으로 RNA 분자를 공격하는 화학시약들(이것들을 chemical nuclease라고 함)이 이용되고 있다.

삼차 상호작용의 분석. 몇 가지 탐침들을 사용해서 수용액에서 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA 분자에서 작용하는 삼차 상호작용들을 분석한 결과들을 근거로 해서 5S rRNA의 고차원 구조를 추론해 보고자 한다.

X. celebensis 5S rRNA의 c 고리의 $U_{35}CCCAU_{40}$에 상보적인 데옥시헥사머(5'-ATGGGA-3')는 $U_{35}CCC_{38}$ 연속부분뿐 아니라 $U_{40}CCC_{43}$ 연속부분과도 혼성체를 만든다는 것을 RNase H로 확인하였다. c 고리가 데옥시헥사머로와 혼성체화되지 않았을 때 DEPC에 의한 카르베톡실화 변형을 받지 않던 아데닌 염기들 중 혼성체화된 다음에 변형되는 것들은 A_{25}, A_{26}, A_{39}, A_{52}, A_{53}, A_{57}, A_{88}, A_{89}, A_{109} 들이다. 이 결과는 c 고리의 염기들이 b 고리, C 줄기에 있는 내밀린 구조, e 고리 및 a 고리의 일부분들과 삼차 상호작용을 한다는 것을 암시한다.[20] 앞에서 기술한 바와 같이, b 고리와 C 줄기로 이루어지는 b-C 구역 $C_{28}AC_{30}/(G/U)_{56}UG_{54}$가 불안정한 구조를 이루고 있다고 추론하였는데, 아마도 그것은 c 고리가 a 고리 또는 e 고리와 삼차 상호작용을 하기 위해서 5S rRNA 분자가 접힐 때 그 구역이 돌쩌귀의 구실을 하면서 이차구조가 부분적으로 해체되기 때문으로 생각할 수 있다.

c 고리와 a 고리 사이에 삼차 상호작용이 있을 것이라는 암시는 Fe(II)-EDTA를 사용한 분석에서도 얻을 수 있다. Fe(II)-EDTA는 염기 순서에 무관하게 단일가닥이나 이중가닥의 포스포디에스테르결합을 절단하지만 삼차원 구조에서 분자의 안쪽에 묻혀있는 부분들은 절단하지 못한다. *X. celebensis* 5S rRNA의 반변성된 상태에서 Fe(II)-EDTA는 c 고리의 A_{39}와 A_{45} 그리고 A 줄기의 U_{110} 들에서 절단하지만 복원된 상태에서는 이 위치의 결합들에서 절단을 일으키지 않는다.[20] 비슷한 결과를 *X. badrii* 5S rRNA에 대한 실험에서도 얻었다.[47] 이 결과들은 a 고리와 c 고리 사이에 삼차 상호작용이 있다는 것을 분명하게 가리키는 것이다. 5S rRNA의 b-C 구역이 돌쩌귀의 구실을 하기 때문에 그 구조가 불안정할 것이라는 것은 Pb^{2+}이 *X. palargonii*와 *P. alcaligenes* 5S rRNA를 절단하는 방식에서도 추측이 가능하다.[48, 57] b-C 구역의 5' 쪽 가닥, 즉 $G_{23}GAACCACCCGA_{34}$ 연속부분은 Pb^{2+}에 의한 절단 반응을 거의 받지 않지만 3' 쪽 가닥은 절단 반응을 받는다. 한편, ENU의 공격에 저항성을 보이는 인산기들도 5' 쪽 가닥에 있고 3' 쪽 가닥에는 없다. 이러한 결과들은 모두 b-C 구역의 3' 쪽 가닥이 삼차 상호작용을 위해서 노출되어 있음을 암시한다.

5S rRNA의 고차원 구조에 대한 모형들. 위에서 우리는 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA 분자의 b-C 구역과 d 고리는 분자가 접힐 때 돌쩌귀 구실을 할 것이라고 추론하였다. 다른 연구자들도 비슷한 특징들을 콩과식물인 루핀과 엿기름 같은 진핵생물들의 5S rRNA에서 관찰하였다.[59] 최근에 Nazar[58]는 Fe(II)-EDTA와 ENU를 사용하여 얻은 결과들에 근거하여 효모의 5S rRNA에서 c 고리와 a 고리 사이에서, 그리고 e 고리와 a 고리 사이에서 삼차 상호작용이 일어나며 이때 d 고리가 돌쩌귀의 구실을 한다고 주장하였다. 그는 이 실험결과에 근거해서 5S rRNA의 고차원 구조에 대한 롤러폴프 모양의 모형을 내놓았다(**그림 5**). 위에서 살펴본 바와 같이, 5S rRNA에서

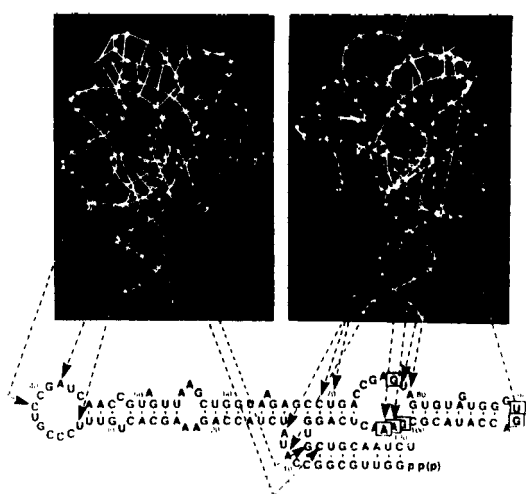


그림 5. Nazar가 효모의 5S rRNA에 대해서 제안한 삼차구조 모형.

의 삼차 상호작용과 관련해서 우리가 얻은 분석결과는 Nazar의 모형과 상당히 합치한다. 최근에 우리 연

그림 6. 두꺼비(*Xenopus*) 난자의 5S rRNA의 삼차원 구조의 입체경 그림.

구진이(η^6-mesitylene) manganese tricarbonyl hexafluorophosphate[MTH-Mn(I)]를 chemical nuclease로 사용해서 *P. alcaligenes* 5S rRNA의 고차원 구조를 분석한 결과에 의하면 a 고리의 $G_{12}AUG_{15}$, b-C 구역의 3′쪽 가닥, 즉 $A_{52}AGUGAAGC_{60}$, B-a 구역의 U_{65}-$AGCG_{69}$, d 고리의 $G_{72}AU_{74}$ 연속부분 들이 tRNA의 L 자형 구조에서 L 자로 꺾기는 모서리 부분과 비슷한 구조를 이룬다는 것을 알았다.[60] MTH-Mn(I)을 사용해서 얻은 이 결과는 b-C 구역과 d 고리가 5S rRNA 분자가 고차원 구조를 만들 때 돌쩌귀와 같은 구실을 한다는 우리의 해석(앞의 절 참조)을 뒷받침하는 확실한 증거라고 생각한다.

다른 한편, Westhof 등[61]은 실험결과들과 자유에너

표 5. 5S rRNA들 사이의 염기 치환율*

	P.men.	P.alc.	P.MA.	P.aci.	P.cep.	P.aer.	P.flu.	P.syr.	P.put.	X.bad.	P.tes.	X.mal.	X.cel.	X.cit.
P.alc.	0.063													
	+0.024													
P.MA.	0.092	0.073												
	+0.030	+0.026												
P.aci.	0.489	0.510	0.574											
	+0.087	0.094	+0.104											
P.cep.	0.515	0.550	0.624	0.133										
	+0.090	+0.098	+0.112	+0.37										
P.aer.	0.457	0.472	0.504	0.372	0.357									
	+0.080	+0.082	+0.087	+0.069	+0.067									
P.flu.	0.411	0.441	0.472	0.375	0.371	0.079								
	+0.074	+0.077	+0.082	+0.070	+0.069	+0.027								
P.syr.	0.397	0.426	0.456	0.360	0.385	0.079	0.017							
	+0.072	+0.076	+0.080	+0.068	+0.071	+0.027	+0.012							
P.put.	0.441	0.456	0.472	0.388	0.385	0.061	0.052	0.052						
	+0.077	+0.080	+0.082	+0.072	+0.071	+0.023	+0.022	+0.022						
X.bad.	0.427	0.419	0.473	0.446	0.463	0.223	0.258	0.258	0.223					
	+0.081	+0.077	+0.088	+0.080	+0.083	+0.049	+0.054	+0.054	0.049					
P.tes.	0.455	0.434	0.509	0.291	0.328	0.256	0.244	0.256	0.256	0.295				
	+0.081	+0.079	+0.090	+0.059	+0.063	+0.053	+0.051	+0.053	+0.053	+0.059				
X.mal.	0.426	0.431	0.442	0.432	0.402	0.289	0.277	0.289	0.314	0.277	0.192			
	+0.076	+0.076	+0.078	+0.077	+0.073	+0.057	+0.055	+0.057	+0.060	+0.055	+0.045			
X.cel.	0.456	0.461	0.472	0.447	0.461	0.339	0.326	0.339	0.353	0.314	0.226	0.052		
	+0.080	+0.081	+0.082	+0.079	+0.081	+0.064	+0.062	+0.064	+0.066	+0.060	+0.050	+0.022		
X.cit.	0.487	0.494	0.503	0.447	0.446	0.352	0.353	0.367	0.367	0.301	0.251	0.052	0.035	
	+0.84	+0.085	+0.086	+0.079	+0.079	+0.065	+0.066	+0.068	+0.068	+0.59	+0.054	+0.022	+0.018	
X.pal.	0.456	0.461	0.472	0.416	0.446	0.326	0.326	0.339	0.339	0.301	0.226	0.034	0.035	0.017
	+0.080	+0.081	+0.082	+0.075	+0.079	+0.062	+0.062	+0.064	+0.064	+0.059	+0.050	+0.017	+0.018	+0.012

*누클레오티드 치환율 Knuc 값과 표준편차는 Kimura의 식[63]에 따라서 계산하였다. 누클레오티드의 결실은 transversion으로 간주하고 계산하였다.

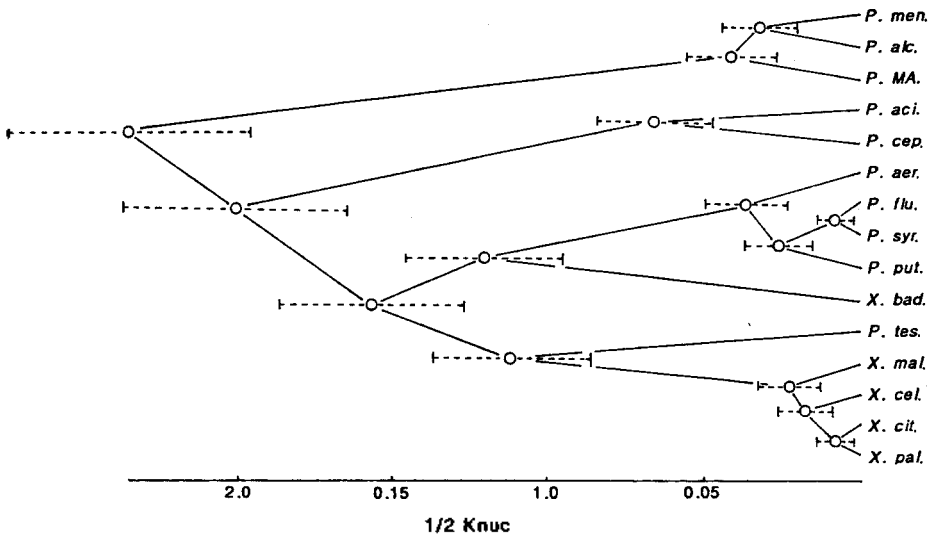


그림 7. 15가지 Pseudomonadaceae의 계통수. 박테리아의 약자에 관해서는 그림 1 참조.

자를 고려하여 개발한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 시금치의 엽록체, 두꺼비(*Xenopus*)의 체세포와 난세포, 대장균 들의 5S rRNA들에 적용할 수 있는 삼차구조 모형을 제안하였는데 그들은 이 모형에서 5S rRNA가 분자 내에서 가짜매듭꼴의 삼차 상호작용을 가지지 않는 Y 자 모양의 구조를 만든다고 주장한다(**그림 6**). 지금으로서는 삼차 상호작용을 철저하게 인식할 수 있는 프로그램이 개발되어 있지 않으므로 컴퓨터를 사용해서 RNA의 고차원 구조의 모형을 제시하는 데에는 한계가 있다. 이 분야의 연구에서 앞으로 중요한 것은 더 많은 실험치들을 얻어서 그것들을 컴퓨터 프로그램을 사용할 때 제약 요소로 삼아야 할 것이다.

Pseudomonadaceae 5S rRNA의 분자 진화

5S rRNA들은 오랜 진화과정을 지나 오면서 그 일차구조와 기능에 큰 변화 없이 보존되어 왔다.[62] 이러한 사실은 5S rRNA의 누클레오티드의 치환 속도가 진화하는 동안 일정하게 유지되어 왔음을 반영하는 것이다. Osawa와 Hori[37]는 5S rRNA의 이 특징을 생물의 분자 진화의 분석에 이용할 수 있다는 것을 광범위한 생물종들의 5S rRNA들의 일차구조로부터 계통수를 구성해 봄으로써 확인하였다.

우리는 **그림 1**에 나타낸 15가지 *Pseudomonadaceae* 5S rRNA 들의 일차구조의 배열에서 누클레오티드들 사이의 치환율 Knuc 값들을 계산하였고(**표 5**), 이 값들에 근거해서 15가지 *Pseudomonadaceae* 종들의 계통수를 재구성하였다(**그림 7**). 이 계통수가 보이는 두드러진 점은 *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. syringe*들로 이루어지는 무리(이들 사이의 Knuc값의 범위는 0.017~0.079)와 *P. mendocina, P. alcaligenes, P. MA*들로 이루어지는 무리(이들 사이의 Knuc값의 범위는 0.063~0.092)는 서로 진화의 거리가 멀기 때문에(Knuc값은 0.411 이상) 별개의 아군에 속할 것이라는 것이다. *P. testosteroni*, 그리고 *P. cepacia*와 *P. acidovorans*도 각각 별개의 아군이 될 것이라는 것을 **그림 7**에서 쉽게 알 수 있다. Palleroni[64]에 따르면 *P. aeruginosa, P. mendocina* 및 *P. alcaligenes* 들은 *Pseudomonas*의 rRNA 1군에서 동일한 아아군으로 분류된다. 그렇지만 본 연구에서 분석한 이 종들의 계통발생의 관계를 보면 *P. aeruginosa*는 *P. alcaligenes*와 *P. mendocina*로부터 진화의 거리가 멀다는 것을 알 수 있다(*P. aeruginosa*와 *P. alcaligenes* 사이의 Knuc 값은 0.472이고, *P. aeruginosa*와 *P. mendoeina* 사이의 Knuc값은 0.457이다). 생리적인 면에서도 전자는 형광성 색소를 생성하는데 반해서 후자의 두 종은 형광 색소를 생성하지 않는다는 특성의 차이가 있다. 따라서 *P. aeruginosa*는 *P. alcaligenes, P. mendocina, P. MA* 들이 속해 있는 아아군에 속하는 것이

아니라 *P. fluorescens*와 *P. putida*가 속해 있는 아아군에 포함시키는 것이 더 타당 할 것으로 생각한다.

아직 Bergey의 편람[65]에 수록되어 있지 않은 종인 *P. MA*는 *P. mendocina*와 *P. alcaligenes* 두 종 모두에게 매우 가까운 진화의 거리에 있다(*P. MA*와 *P. mendocina* 사이의 Knuc값은 0.092이고, *P. MA*와 *P. alcaligenes* 사이의 Knuc값은 0.073이다). 따라서 이 세 종들은 한 아아군을 이룰 것으로 추측된다. 앞에서 우리는 *P. mendocina, P. alcaligenes, P. MA*들의 5S rRNA의 E 줄기에 비표준형 염기쌍 U_{83} · U_{95}를 가지는 특성에서 이 세 박테리아가 기능적으로도 매우 가까운 유연관계가 있을 것이라고 유추하였는데, 이들의 5S rRNA들의 일차구조에서 재구성한 계통수도 그것들이 진화적으로 매우 가까운 관계에 있음을 가리키고 있다(**그림 7** 참조). 그림 7에서 *X. badrii*가 그 밖의 네 가지 *Xanthomonas* 종들이 이루는 무리에 속하지 않음을 볼 수 있는데, 아마도 이것은 *X. badrii*가 적색 색소를 생산하는 데 반해서 다른 *Xanthomonas* 들은 황색 색소를 생산하는 대사 경로의 차이를 반영하는 것이 아닌가 추측된다. 이와 같이, 15가지 밖에 안되는 *Psendomonadaceae* 5S rRNA들의 일차구조들을 근거로 해서 재구성한 계통수이지만 이 계통수는 분자 진화와 대사과정의 진화에 관해서 중요한 정보를 제공하고 있음을 알 수 있다.

전 망

Pseuomonadaceae 5S rRNA들은 일차구조와 이차구조에서 다른 생물종들의 것들과 마찬가지로 서로 공통되는 구조 요소들을 많이 보유하고 있다. 이러한 특성들은 앞으로 5S rRNA가 단백질 합성에서 맡은 구실을 설명하는 데 중요한 정보가 되리라고 생각한다. 가까운 장래에 5S rRNA의 x-선 결정 구조가 밝혀질 것으로는 기대할 수 없으므로, 우리는 5S rRNA의 고차원 구조에 관한 지식을 용액에서의 구조연구에서 얻어야 할 것이다. 5S rRNA의 고차원 구조에 관해서는 오늘날 두 모형이 제안되어 있는데 이것들만으로는 아직 용액에서의 고차원 구조를 만족스럽게 설명하지 못하고 있다. 앞으로 해야 할 일은 효소 탐침과 화학 탐침, 구조-특이적으로 RNA에 작용하는 chemical nuclease들을 사용한 분석치들을 가능한 많이 얻어서 이미 제안한 모형들을 다듬고 보완하는 것이라고 생각한다.

최근에 와서 용액에서의 RNA의 구조 연구에 NMR 분광법이 훌륭한 방법으로 사용되고 있다. 그러나 현재로서는 누클레오티드 수가 약 30개 이하(분자량 약 10000 이하)의 작은 올리고누클레오티드의 연구에 한정되어 있다. 그러나 앞으로 NMR 분광법은 RNA의 구조연구에서 큰 발전을 이룰 것으로 기대한다. 최근에 일부 연구자들은 이미 NMR 분광법과 원편광이색(CD) 분광법을 병용하여 5S rRNA-리보솜 단백질 복합체 구조의 연구에서 중요한 기초정보를 단편적으로 얻고 있다. 5S rRNA의 분자 진화에 관한 연구는 박테리아 세포 내에서 일어나는 단백질 생합성 기구의 진화를 밝힐 수 있는 중요한 정보를 제공하리라고 기대한다.

이 연구는 1996년도 교육부 기초과학 육성 연구비(과제번호 BSRI 96-3418)의 지원으로 수행되었으며, 김상범은 1996년도 서울대학교 자연과학종합연구소의 박사후 과정 특별연구원 연구지원을 받았다.

인 용 문 헌

1. Rosset, R.; Monier, R.; Julien, J. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1964**, *46*, 87.
2. Specht, T.; Szymanski, M.; Barciszewska, M. Z.; Barciszewska, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 96.
3. Erdmann, V. A.; Huysmans, E.; Vandenberghe, A.; De Wachter, R. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, r105.
4. Kumagai, I.; Bartsch, M.; Subramanian, A.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *4*, 961.
5. Wolters, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16(supp.)*, r1.
6. Stahl, D. V.; Luehrsen, K. R.; Woese, C. R.; Pace, N. R. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 6129.
7. Kowalak, J. A.; Pomerantz, S. C.; Crain, P. F.; McClockey, J. A.; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4577
8. Limbach. P. A.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2183.
9. Brownlee, G. G.; Sanger, F.; Barrell, B. G. *Nature* **1967**, *215*, 735.
10. Donis-Keller, H.; Maxam, A. M.; Gilbert, R. A. *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2527.
11. Donis-Keller, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1980**, *8*, 3133.

12. Peattie, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1979**, *76*, 1760
13. 조봉래, 박사학위논문, 서울대학교, 1993.
14. Dams, E.; Vandenberghe, A.; De Wachter, R. *Nucleic Acids Res*. **1983**, *11*, 1245.
15. 조봉래, 고문주, 임자혜, 박인원 한국생화학회지, **1991**; *24*, 292.
16. 고문주, 박인원, 이세영 한국생화학회지, **1986**, *19*, 61
17. 조봉래, 이승주, 심윤보, 고문주, 박인원 대한화학회지, **1992**, *37*, 364.
18. 조봉래, 고문주, 임자혜, 박인원 한국생화학회지, **1991**, *24*, 55.
19. 조봉래, 최명언, 서세원, 임자혜, 고문주, 박인원 대한화학회지, **1992**, *36*, 460.
20. 조봉래, 이영훈, 최명언, 박인원 대한화학회지, **1992**, *37*, 237.
21. 고문주, 박인원, 이강렬 한국생화학회지, **1988**, *21*, 195.
22. 고문주, 박인원, 이강렬 한국생화학회지, **1987**, *20*, 357.
23. Vandenberghe, A.; Wassink, A.; Raeymaekers, P.; De Baere, R.; Huysmans, E.; De Wachter, R. *Eur. J. Biochem*. **1985**, *149*, 537.
24. 고문주, 이종태, 박인원 한국생화학회지, **1989**, *22*, 68.
25. 고문주, 박인원 한국생화학회지, **1989**, *22*, 430
26. 이승주, 고문주, 남정이, 박인원 한국생화학회지, **1990**, *23*, 135.
27. Fresco, J. R.; Klotz, L. C.; Richards, E. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. **1963**, *28*, 83.
28. Tinoco, I. Jr.; Uhlenbeck, O. C.; Levine. *Nature*, **1971**, *230*, 363.
29. Jaeger, J. A.; Turner, D. H.; Zuker, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1989**, *86*, 7706
30. Walter, A. E.; Turner, D. H.; Kim, J.; Lyttle, M. H.; M ller, P.; Mathews, D. H.; Zuker, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, *91*, 9128.
31. Abrahams, J. P.; van den Berg, M.; van Batenburg, E.; Pleij, C. *Nucleic Acids Res*. **1990**, *18*, 3035.
32. Fox, G. E.; Woese, C. R. *Nature*, **1975**, *256*, 505.
33. Ehresmann, C.; Baudin, F.; Mougel, M.; Romby, P.; Ebel, J.-P.; Ehresmann, B. *Nucleic Acids Res*. **1987**, *15*, 9109.
34. Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Romby, P.; Mougel, M.; Baudin, F.; Westhof, E.; Ebel, J.-P. In *Ribosome: Structure, Function & Evolution*; Hill, W. E.; Moore, P. B.; Dahlberg, A.; Schlessinger, D.; Garrett, R. A.; Warner, J. R., Eds.; *American Society for Microbiology*; Washington, U. S. A. 1990; pp 148-159.
35. Noller, H. F.; Moazed, D.; Stern, S.; Powers, T.; Allen, P. N.; Robertson, J. M.; Weiser, B.; Triman, K. In *Ribosome : Structure, Function & Evolution*; Hill, W. E.; Moore, P. B.; Dahlberg, A.; Schlessinger, D.; Garrett, R. A.; Warner, J. R., Eds.; *American Society for Microbiology*; Washington, U. S. A. 1990; pp 73-92.
36. Kim, S.; Lee, Y.; Park; I. *Bull. Korean Chem. Soc*. **1996**, *17*, 951.
37. Osawa, S.; Hori, H. In *Ribosome : Structure, Function, and Genetics*; Chambliss, G.; Craven, G. R.; Davis, J.; Davis, K.; Kahan, L.; Noman, M., Eds.; University Park Press: Baltimore, U. S. A. 1988; p 333.
38. De Wachter, R.; Chen, M.-W.; Vandenberghe, A. *Biochimie* **1982**, *64*, 311.39. Nishikawa, K.; Takemura, S. *J. Biochem*. **1977**, *81*, 995.
40. Stundicka, G. M.; Eiserling, F. A.; Lake, J. *A. Nucleic Acids Res*. **1981**, *9*, 1885.
41. Pieler, T.; Erdmann, V. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1982**, *79*, 4599.
42. Wolters, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res*. **1988**, *16*, r1.
43. 조봉래, 김성우, 김영구, 이종태, 강신홍, 이승주, 심윤보, 고문주, 박인원, 제 1차 생체분자 심포지움 회보, 대한화학회, 1991; p 9.
44. 조봉래, 이승주, 심윤보, 고문주, 박인원 대한화학회지, **1993**, *37*, 364.
45. Specht, T.; Wolters, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res*. **1990**, *18*, 2215.
46. 고문주, 김영구, 박인원 한국생화학회지, **1987**, *20*, 79.
47. 심윤보, 조봉래, 이영훈, 박인원 한국생화학회지, **1994**, *27*, 466.
48. 조봉래, 김상범, 이영훈, 박인원 대한화학회지, **1995**, *3*, 9.
49. Cheong, C.; Varani, G.; Tinoco, I. *Nature* **1990**, *346*, 680.
50. Kim, S.; Cho, B.; Lee, Y.; Park, I. *J. Biochem. Mol. Biol*. **1996**, *29*, 133.
51. Noller, H. F. *Ann. Rev. Biochem*. **1984**, *119*, 53.
52. Scott, W. G.; Murray, J. B.; Arnold, J. R. P.; Stoddard, B. L.; Klug, A. *Science* **1996**, *274*, 2065.
53. Wimberly, B.; Varani, G.; Tinoco, I. Jr. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 1078.
54. van den Eynde, H.; Stakebrandt, E.; De Wachter, R. *FEBS Lett*. **1987**, *213*, 301.

55. Morikawa, K.; Kawakami, M.; Takemura, S. *FEBS Lett.* **1982**, *145*, 194
56. Lorenz, S.; Betzel, C.; Radersball, E.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Erdmann, V. A.; *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 399.
57. 김상범, 이영훈, 박인원 대한화학회지, **1995**, *39*, 453.
58. Barciszewska, M. Z.; Lorenz, S.; Joachimiak, A.; Ulbrich, N., Erdmann, V. A.; Barciszewski, J. *FEBS Lett.* **1990**, *269*, 83.
59. Nazar, R. N. *J. Biol. Chem.* **1991**. *266*, 4562.
60. 김상범, 박사학위논문, 서울대학교, 1996.
61. Westhof, E.; Romby, P.; Romamniuk, P. J.; Ebel, J.-P.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B. *J. Mol. Biol.* **1989**, *207*, 417.
62. Fox, G. E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R. B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T. A.; Wolfe, R. S.; Balch, W. E.; Tanner, R. S.; Magrum, L. J.; Stahl, D. A.; Luehrsen, K. R.; Chen, K. M.; Woese, C. R. *Science* **1980**, *209*, 457.
63. Kimura, M. J. *J. Mol, Evol.* **1980**, *16*, 111.
64. Palleroni, N. J. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Krieg, N. R.; Holt, J. G., Eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, U. S. A., 1984; pp 141-199.
65. Krieg, N. R.; Holt, J. G. Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Krieg, N. R.; Holt, J. G., Eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, U. S. A., 1984.