

Escherichia coli 16S rRNA 상의 770 위치에 염기치환을 가진 변이체 리보솜의 단백질 합성 능력을 회복시키는 이차복귀돌연변이체의 발체

하혜정 · 류상미 · 이강석* · 전체옥*
중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

Received: October 18, 2010 / Revised: January 27, 2011 / Accepted: February 20, 2011

Functional Analysis and Selection of Second-site Revertant of *Escherichia coli* 16S rRNA of C770G. Ha, Hye-Jeong, Sang-Mi Ryou, Kangseok Lee*, and Che Ok Jeon*. Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea – It has been shown that a nucleotide substitution at position 770 in *Escherichia coli* 16S rRNA, which is implicated in forming the evolutionary conserved B2c intersubunit bridge, has a detrimental effect on ribosome function. In order to isolate second-site revertants that complement ribosomes containing C770G, we performed a random mutagenesis of the 16S rRNA gene and selected clones that could produce more CAT protein translated by specialized ribosome. One of the clones contained two nucleotide substitutions at positions 569 and 904 (C569G and U904C) and these mutations partially complemented the loss of protein-synthesis ability caused by C770G. Further studies using the isolated revertant will provide information about which part of 16S rRNA is interacting with C770 and the consequence of the structure formed by these interactions in the process of protein synthesis.

Key words: B2c, error-prone PCR, rRNA, ribosome

서 론

리보솜(ribosome)은 리보핵산단백질(ribonucleoprotein; RNP) 입자들의 복합체이며, 세포의 성장과 생존에 필요한 모든 단백질을 생합성하는 장소를 제공해주는 기능을 한다[2, 14]. 세균의 리보솜은 2개의 서로 다른 크기의 소단위체(subunit)들로 이루어져 있다. 리보솜은 30S와 50S 입자 상태로 각각의 소단위체로 존재하다가 단백질 합성 시에는 이 두 단위체가 합쳐져 70S 입자를 이룬 뒤 단백질 생합성을 시작하게 된다. 대장균에서 리보솜의 작은 소단위체인 30S 입자는 16S 리보솜 RNA(rRNA)와 21개의 단백질로 이루어져 있고, 큰 소단위체인 50S 입자는 23S rRNA와 5S rRNA, 그리고 33개의 단백질들로 이루어져 있다. 특히, 이 두 소단위체들의 연결 고리 역할을 하는 인터브리지(intersubunit bridge)들은 rRNA들로 이루어져 있으며, 어떤 rRNA 잔기들이 모여 인터브리지를 이루는지, 어느 위치에 존재하며 다른 단백질들과 상호작용에 의한 구조 변화 등에 대한 연구

들이 여러 가지 생화학적 실험기법들을 이용해 밝혀지고 있다[5, 9, 13]. 또한, 리보솜 내에서 일어나는 인터브리지와 연관된 단백질-RNA, 단백질-단백질 상호작용, RNA-RNA 작용에 대해서도 구조 연구에 의해 이미 세부적인 부분까지 확인된 바가 있다[6, 17, 18].

인터브리지들은 리보솜의 기능적 구조를 안정적으로 지탱해 주는 역할을 할 뿐만 아니라, 단백질 합성시 이들의 구조를 유연하게 변형시켜, 30S에 위치하여 전령 RNA(messenger RNA)의 암호가 해독이 일어나는 부호해독중추(decoding center)로부터 50S에 위치한 펩타이드가 합성이 되는 장소인 반응중추(reaction center)까지 신호전달 연결관(conduits)의 역할도 수행하며 동시에 단백질 생합성에 관여하는 여러 인자들과 함께 소단위체들의 역동적인 움직임에 영향을 미친다고 알려져 있다[8, 18]. 특히, 리보솜의 소단위체 결합부위에 위치해 있는 각각의 잔기들이 전체 인터브리지 중 80% 이상 차지한다고 알려져 있다[7]. 최근까지의 RNA를 바탕으로 한 구조 분석을 한 결과로 리보솜의 인터브리지들 중 매우 보존된 부위로서 16S rRNA의 C770, G771, C899, G1514 잔기와 23S rRNA의 C1832, C1833 잔기들로 구성된 인터브리지로서 B2c가 알려져 있다[15, 16]. 리보솜의 소단위체간의 결합에 B2c와 관련하여 어떤 잔기들이 참여되는지는 밝혀져 있지만, 그들의 단백질 생합성과 관련된 직접적인 기능으로서의 특징은 아직 밝혀진 바가 없다. 따라

*Corresponding author

K. Lee

Tel: +82-2-820-5241, Fax: +82-2-825-5206

E-mail: kangseok@cau.ac.kr

C. O. Jeon

Tel: +82-2-820-5864

E-mail: cojeon@cau.ac.kr

서 본 연구에서는 B2c 인터브리지의 핵심적인 역할을 하는 16S rRNA 잔기인 C770과 기능적으로 연관된 16S rRNA 염기들을 선별하기 위해 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주는 *Escherichia coli* DH5 α (F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hdsR17*(*rk-*, *mk+*), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*)이며, LB 배지를 사용하여 배양하였다.

플라스미드의 제조 및 특징

16S rDNA 코딩부분만을 다루기 용이하도록 플라스미드 pASS3을 제작하였다. 먼저 플라스미드 pASS2[1]의 N-*cat* 유전자 부분과 *lacI* repressor, 16S rDNA 유전자를 *NcoI* 제한효소로 절단한 후, *NcoI* 제한효소로 절단된 p16ST122[11] 플라스미드에 삽입하였다. 플라스미드 pASS3의 특징은 다음과 같다. 첫째, pKK3535[3]에서 기원한 *rrnB* 오페론을 가지고 있으며 *lacUV5* 프로모터에 의해 전사가 조절된다. 또한 p16ST122 플라스미드에서 기원한 *cat*(chloramphenicol acetyl transferase) 유전자를 가지고 있으며 트립토판 프로모터(*P_{trp}^c* 프로모터)에 의해 전사가 조절된다. 둘째, Lac 억제자를 발현하는 *lacI^q* 유전자[4]를 가지고 있다. 셋째, CAT mRNA의 RBS(ribosome binding sequence)는 야생형인 5'-GGAGG에서 5'-AUCCC로 변형되어있고, 16S rRNA 유전자의 MBS(mRNA binding sequence)는 야생형인 5'-CCUCC에서 5'-GGGAU로 변형되어 있다. 넷째, IPTG가 없는 배지에서는 pASS3을 가지고 있는 대장균 세포는 *cat* mRNA를 해독할 수 있는 재조합 리보솜의 부재로 인해 클로람페니콜(chloramphenicol)에 대한 저항성이 낮으며(최소생장억제농도 = 100 μ g/ml), 0.1 mM IPTG가 포함된 배지에서는 재조합 리보솜이 발현되어 높은 농도의 클로람페니콜(최소생장억제농도 = 600 μ g/ml)에 저항성을 갖게 된다.

다음으로 플라스미드 pASS3에 있는 16S rRNA의 770번째 잔기인 C를 G로 치환시키기 위해, 플라스미드 pRNA122-G770[10]으로부터 *Bgl*II, *Dra*III 제한효소로 절단하여 얻어진 부위를 동일한 제한효소를 사용하여 pASS3에 클로닝하여 pASS3-C770G 플라스미드를 제조하였다. 그 후 pASS3-C770G 플라스미드를 주형으로 삼아 16S rDNA 유전자 부위에 무작위 염기치환을 일으키기 위해 PCR 반응에 0.1 mM의 MnCl₂을 첨가하여 얻은 돌연변이 DNA 단편들을 *Bgl*II, *Dra*III로 절단한 후, 동일한 제한효소를 사용하여 pASS3-C770G에 삽입시켜, C770G의 이차복귀돌연변이체들을 얻었다. 이 때 사용되었던 프라이머는 16S-537F(5'-GGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAA-3')와 16S-1534R(5'-TGATCCAACCGCAGGTTTC-3')이며, PCR 반응의 조건은

94°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 90초의 주기로 30번을 반복하였다.

웨스턴 블롯 분석

플라스미드 pASS3을 가진 세포를 암피실린(ampicillin, 0.1 mg/ml)이 포함된 배지에서 OD₆₀₀=0.1이 될 때까지 배양한 후, 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 재조합 플라스미드로부터 기원한 SSU rRNA를 발현시키는 동시에 CAT mRNA의 합성을 유도하였다. OD₆₀₀=1.2에 이를 때, 배양액을 13,000 \times g에서 3분 동안 원심 분리하여 세포를 모아 PBS(phosphate buffered saline) buffer에 섞은 후, SDS-PAGE 샘플 buffer (100 mM Tris-Cl; pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 30% glycerol, 200 mM β -mercaptoethanol)에 넣고 10분 동안 끓인 후, 10% acrylamide 겔에서 전체 단백질들을 분리하였다. 분리된 단백질들을 nitrocellulose membrane (Protran®, 0.45 μ m; Whatman)에 옮긴 다음, 항 CAT(Sigma), 항 S1[19] 항체를 이용하여 분석하였다. 단백질 밴드의 상대적인 양은 Versa Doc 이미징 시스템과 Quantity One 소프트웨어를 이용하여 정량하였다.

최소생장억제농도 측정(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

암피실린(ampicillin, 0.1 mg/ml)이 포함된 배지에서 12시간 배양한 후, 같은 배지에서 1:40 비율로 희석시키고, OD₆₀₀=0.1이 될 때까지 배양한 후, 0.1 mM IPTG를 첨가 후 2-3시간 동안 CAT-mRNA 만을 해독하는 특수화된 리보솜의 생성을 유도시킨다. 다음으로 대략 10⁴개의 세포를 0.1 mM IPTG, 암피실린(ampicillin, 0.1 mg/ml), 그리고 클로람페니콜의 농도가 각각 0, 50, 100, 200, 300 μ g/ml 포함된 배지에서 20시간 동안 배양시킨다. 이 때, 세포의 성장을 완전히 저해시킬 수 있는 클로람페니콜의 가장 낮은 농도가 세포의 클로람페니콜에 대한 최소생장억제농도가 된다[11, 12].

결과 및 고찰

최근까지 rRNA의 기능을 유전학적으로 연구하는데 있어서의 가장 큰 문제점은 세포의 정상적인 기능을 저해하지 않고 오직 단백질 합성에만 영향을 미치는 rRNA 염기변형 돌연변이들을 직접적으로 얻기가 힘들다는 것이다. 그 이유는 rRNA의 대부분에 걸쳐 염기변형이 일어나게 되면 세포의 단백질 합성능력에 치명적인 영향을 주고 그로 인해 세포가 잘 자라지 못하거나 죽기 때문이다. 이러한 한계를 극복하기 위해 세포의 정상적인 성장에는 영향을 미치지 않고, rRNA 염기변형 돌연변이만을 발취할 수 있는 효과적인 유전학적 방법으로 최근에 16S rRNA의 기능을 in vivo에서 유전학적으로 분석할 수 있는 시스템을 개발되었다[11, 12]. 이 시스템을 기반으로 본 연구에서는 pASS3 플라스미드의

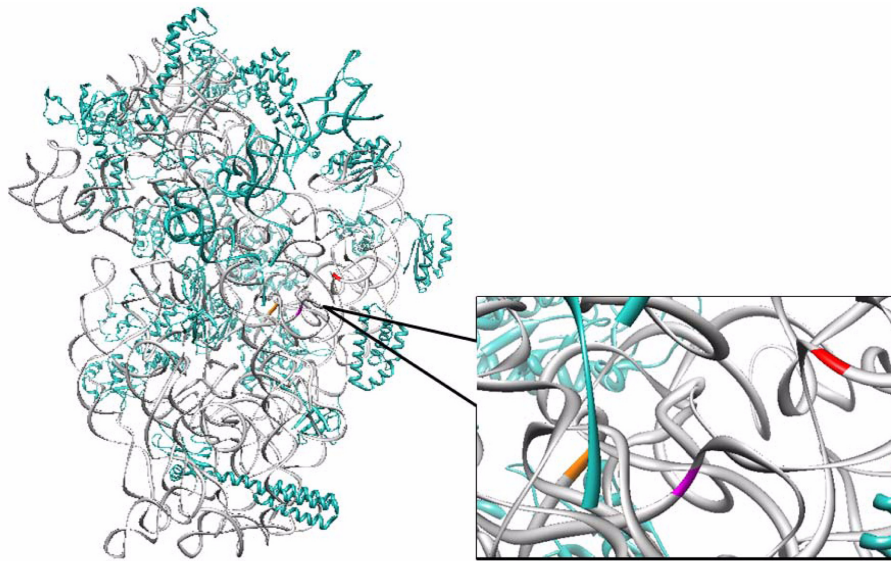


Fig. 1. Location of the mutated nucleotides in a three-dimensional structure of *E. coli* 30S subunit. Location of C569, U904, C770 are colored with orange, magenta and red, respectively. Ribosomal proteins and rRNA are shown in light sea green and grey, respectively.

16S rRNA 유전자의 C770 부위에 G로 염기치환을 일으켜 단백질 합성 능력이 저하된 리보솜 돌연변이체를 만든 후, pASS3-770G를 가진 세포(최소억제농도 Cm 150 µg/ml)보다 높은 농도에서 성장하는 콜로니 100개 중 20개의 이차복귀돌연변이체들을 발체하였으며, DNA 염기분석 결과 이 중 하나에서 C569G, U904C의 염기치환을 가진 것으로 확인하였다(Fig. 1).

선별된 이차복귀돌연변이체의 단백질 합성능력의 변화를 알아보기 위해서 클로람페니콜(Cm)에 대한 최소억제농도를 측정해 본 결과, 770 위치에서 야생형인 C에서 G로 치환된 돌연변이체를 발현하는 대장균들은 클로람페니콜에 대한 최소억제농도가 600 µg/ml에서 100 µg/ml로 급격히 낮아진 데에 반해, 발체된 이차돌연변이복귀체는 클로람페니콜에 대

한 최소억제농도를 200 µg/ml로 증가시키는 것을 관찰할 수가 있었다(Fig. 2). 이와 같은 사실로 유추해 볼 때, 변이체 C770G가 가지는 상실된 단백질 합성기능을 이차복귀돌연변이체가 기능을 어느 정도 보완시킴을 짐작할 수 있다. 특히, 이차복귀돌연변이체가 가지는 U904C는 리보솜의 인터브리지들 중에서 리보솜의 소단위체간의 조합에 있어서 매우 강력한 영향을 끼치는 B2c의 구성잔기이기도 하다[7]. 또한, 각각의 변형된 리보솜을 가진 세포들의 단백질 합성능력을 직접적으로 확인하기 위해 야생형과 변형된 리보솜에 의해 만들어지는 CAT 단백질의 양을 확인 한 결과, 예상한 바와 같이 C770G는 야생형보다 약 13.4배나 감소하였고, 이를 보완하는 이차복귀돌연변이체는 C770G보다 약 1.8배 증가됨을 관찰할 수가 있었다(Fig. 2).

이 결과로, C770 염기가 리보솜의 단백질 합성 수행능력에 매우 중요한 역할을 한다는 사실과 B2c 인터브리지의 또 다른 잔기인 U904와 C569가 저하된 리보솜(C770G-리보솜)의 단백질 합성 기능을 어느 정도 회복시킴을 확인할 수가 있었다.

리보솜의 3차 구조에서 염기치환이 일어난 두 잔기가 C770G가 가깝게 존재하므로, 리보솜의 소단위체 결합 시 이 잔기들이 관여한다는 것은 유추할 수 있다(Fig. 1). 하지만, 단백질합성 과정 중에서 리보솜의 역동적 움직임을 감안할 때, 이 잔기들의 치환이 C770G에 의한 리보솜 기능저하를 어느 정도 회복시키는 이유를 알려진 리보솜의 구조를 바탕으로 설명하기는 힘들다. C770-리보솜과 C569/C770/U904 리보솜을 정제하여 다양한 생화학적 방법을 이용하여 분석하면 이차복귀의 기작을 규명함은 물론이고, 770 염기가 단백질 합성 과정 중에서 16S rRNA의 또 다른 어떤 부위와

	ΔCAT	WT	MT	RT
anti-S1				
anti-CAT				
relative amount of CAT	0.00	13.41	1.00	1.87
MIC (µg/ml)	0	600	100	200

Fig. 2. Functional analysis of the mutant ribosomes. Western blot analysis was performed to quantitate CAT protein synthesized in *E. coli* cells expressing pASS3-derived ribosomes (WT; wild-type ribosome, MT; mutant ribosome containing C770G, RT; revertant ribosome containing C770G, C569G, U904C). Minimal inhibitory concentration (MIC) of chloramphenicol for *E. coli* cells expressing pASS3-derived ribosomes is also measured.

결합을 하는지, 그러한 결합으로 만들어지는 구조가 갖게 되는 기능이 무엇인지, 그 결합으로 인해 또 다른 잔기와의 결합에 있어서 생기는 변화와 이로 인한 리보솜의 기능 변화 등에 관한 구체적인 단백질 합성기작 연구에 도움이 될 것으로 기대한다.

요 약

대장균의 16S rRNA 염기 중 진화적으로 매우 보존되어 있는 B2c 인터브리지의 구성요소 중 하나인 C770염기에 치환을 일으키면 단백질 합성이 저하되는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서는 770 위치에 C에서 G로 염기치환(C770G)된 16S rRNA의 기능을 회복시키는 이차복귀돌연변이(second-site revertant)를 얻기 위해 16S rRNA를 암호화하는 DNA 부분에 무작위로 염기치환을 유발시켜, 재조합 리보솜이 번역하는 CAT mRNA로부터의 단백질 합성능력이 향상된 클론을 선별하였다. 이 실험으로 C770G 염기치환을 가진 변이체 리보솜의 단백질 합성능력을 일부 회복시키는 하나의 이차복귀돌연변이체를 획득하였으며, DNA 염기분석을 통하여 C569G와 U904C 염기치환을 가진 것을 확인하였다. 이러한 연구결과를 이용하여 770 염기가 단백질 합성 과정에서 16S rRNA의 어떤 다른 부분과 결합을 하는지, 또한 그러한 결합으로 이루어지는 구조가 가지게 되는 기능은 무엇인지 등에 대한 리보솜의 구체적인 단백질 합성기작 연구에 도움이 될 것으로 기대한다.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Korean Research Foundation (313-2008-E00512).

REFERENCES

1. 김종명, 고하영, 송우석, 류상미, 이강석. 2006. *Escherichia coli* 16S rRNA의 789 염기의 기능분석 및 이차복귀돌연변이체 발체를 위한 방법 개발. *미생물학회지*. **42**: 156-159.
2. Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920.
3. Brosius, J., T. Dull, D. Sleeter, and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**: 107-127.
4. Calos, M. P. 1978. DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an "up" promoter mutation. *Nature* **274**: 762-765.
5. Chapman, N. M. and H. F. Noller. 1977. Protection of specific sites in 16S RNA from chemical modification by association of 30S and 50S ribosomes. *J. Mol. Biol.* **109**: 131-149.
6. Gabashvili, I. S., R. K. Agrawal, C. M. Spahn, R. A. Grassucci, D. I. Svergun, J. Frank, and P. Penczek. 2000. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* **100**: 537-549.
7. Gao, H., J. Sengupta, and M. Valle *et al.* 2003. Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using realspace refinement. *Cell* **113**: 789-801.
8. Hennelly, S. P., A. Antoun, M. Ehrenberg, C. O. Gualerzi, W. Knight, J. S. Lodmell, and W. E. Hill. 2005. A time-resolved investigation of ribosomal subunit association. *J. Mol. Biol.* **346**: 1243-1258.
9. Herr, W. and H. F. Noller. 1979. Protection of specific sites in 23S and 5S RNA from chemical modification by association of 30S and 50S ribosomes. *J. Mol. Biol.* **130**: 421-432.
10. Kim, H.-M., J.-H. Yeom, H.-J. Ha, J.-M. Kim, and K. Lee. 2007. Functional analysis of the residues C770 and G771 of *E. coli* 16S rRNA implicated in forming the intersubunit bridge B2c of the ribosome. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**(7): 1204-1207.
11. Lee, K., C. A. Holland-Staley, and P. R. Cunningham. 2001. Genetic approaches to studying protein system: effects of mutations at W516 and A 535 in *Escherichia coli* 16S rRNA. *J. Nutr.* **131**: 2994S-3004S.
12. Lee, K., S. Varma, J. Santalucia Jr., and P. R. Cunningham. 1997. *In vivo* determination of RNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **269**: 732-743.
13. Merryman, C., D. Moazed, G. Daubresse, and H. F. Noller. 1999. Nucleotides in 23S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **285**: 107-113.
14. Schluenzen, F., A. Tocilj, and R. Zarivach *et al.* 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615-623.
15. Schuwirth, B. S., M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, and J. H. Cate. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**: 827-834.
16. Selmer, M., C. M. Dunham, F. V. Murphy 4th, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, and V. Ramakrishnan. 2006. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**: 1935-1942.
17. Spahn, C. M., E. Jan, A. Mulder, R. A. Grassucci, P. Sarnow, and J. Frank. 2004. Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: The IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* **118**: 465-475.
18. Wilson, D. N., F. Schluenzen, J. M. Harms, T. Yoshida, T. Ohkubo, R. Albrecht, J. Buerger, Y. Kobayashi, and P. Fucini. 2005. X-ray crystallography study on ribosome recycling: The mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *EMBO J.* **24**: 251-260.
19. Yeom, J.-H. and K. Lee. 2006. RraA rescues *Escherichia coli* cells over-producing RNase E from growth arrest by modulating the ribonucleolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 1372-1376.