

Streptomyces coelicolor 리보핵산내부분해효소 RNase ES의 결합단백질 규명 및 기능분석

김종명 · 송우석 · 김현리 · 고하영 · 이강석*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

*Escherichia coli*에서 RNA 분해와 가공에 있어서 중심적인 역할을 하는 RNase E의 동족체 단백질인 *Streptomyces coelicolor* RNase ES의 결합 단백질을 항체침전을 이용하여 탐색하였다. 무기인산을 이용하는 polyphosphate kinase와 리보핵산외부분해효소인 polynucleotide phosphorylase의 동족체인 GPSI가 RNase ES와 함께 침전되는 것을 확인하였으며, 이는 *S. coelicolor*에도 *E. coli* RNase E를 매개로 구성되는 다단백질복합체인 degradosome이 RNase ES에 의해 형성될 수 있음을 암시한다. 계통적으로 멀리 떨어진 이 두 세균에서 정제된 polynucleotide phosphorylase 동족체는 시험관에서의 RNA 분해 특성이 서로 유사함을 보였다. 이러한 실험 결과는 RNase ES가 *E. coli* degradosome과 유사한 기능과 구조를 가진 단백질 복합체를 형성함을 시사한다.

Key words □ degradosome, polynucleotide phosphorylase, polyphosphate kinase, RNase ES, *S. coelicolor*

RNA의 성숙(maturation) 속도와 안정성(stability) 정도는 전사 속도와 함께 유전자 발현 정도를 결정짓는 중요한 인자이다. 세포내에서 발생하는 여러 조절 신호에 대해 mRNA 안정성의 조절을 통해 유전자 발현 양상을 급격하게 변화시킴으로서 다양한 환경적, 생리적 변화에 대한 즉각적인 반응을 가능하게 하는 것으로 알려져 있다. RNA를 분해하는 효소는 RNA의 염기배열과 이차구조에 내재된 특이적인 신호에 따라 반응하며, RNA에 존재하는 분해효소의 절단자리는 RNA의 반감기 또는 그 기능을 결정한다. 이러한 RNA의 가공 작용과 분해 작용은 다양한 리보핵산 분해효소의 상호작용으로 이루어지며, RNA를 어떻게 분해하는가에 따라 크게 리보핵산내부분해효소(endoribonuclease)와 리보핵산외부분해효소(exoribonucleases)의 두 가지로 나눌 수 있다.

*E. coli*에서 mRNA 분해에 있어서 중심적인 역할을 하는 것은 RNase E (Rne 단백질)로 알려져 있으며, 세균에서는 가장 잘 보존된 리보핵산분해효소 중의 하나이다(1, 3, 11). RNase E는 ribosomal 9S RNA 전사체로부터 p5S RNA를 생산시키는 효소로 처음 발견되었으며, AU 염기가 많이 존재하는 단일 RNA 부분을 선별적으로 절단하며, 대장균에서는 생존에 필수적인 단백질이다(1). 그 후 이 효소는 tRNA, 16S rRNA와 RNase P를 구성하는 M1 RNA등과 같은 non-coding RNA를 가공하는데도 역할을 하며, 대부분의 mRNA의 분해에 기여하는 것으로 알려졌다(5, 14, 8, 10). RNase E는 1061개의 아미노산으로 이루어졌으며 여러 개의 도메인(domain)을 가지고 있다. Rne 단백질의 아

미노기 부분의 절반은 RNA 절단기능을 가지며, 이 기능을 가진 아미노기 부분을 포함한 498개의 아미노산만이 발현된 세포도 생존이 가능하다(16). 카르복실기 부분은 아르기닌(arginine)이 많이 포함되어 있는 RNA-결합 도메인, 그리고 degradosome을 구성하고 있는 리보핵산외부분해효소인 polynucleotide phosphorylase (PNPase), RhlB RNA helicase, enolase, polyphosphate kinase (Ppk), poly(A) polymerase (PAPI), GroEL, DnaK 등이 결합체를 이루는 도메인으로 이루어져 있다(2, 13, 15, 17, 19, 20). RNA degradosome은 대장균에서 RNA 분해와 가공에 관여하는 다단백질복합체로서, RNase E와 PNPase는 복합체 내에서 다른 구성성분들과 함께 mRNA의 분해 작용을 수행할 수 있도록 직접적이고 물리적인 연결을 가능하게 하고, enolase는 당대사에 관련된 mRNA 분해에 관련이 있는 것으로 알려져 있다(18, 19). 또한 RNA helicase는 PNPase의 효소작용이 진행될 때 방해가 되는 hairpin과 같은 RNA 2차 구조를 풀어주는 역할을 한다. 이 외에 단백질 인자 RraA와 B(regulator of RNase activity A와 B)가 Rne 단백질의 각기 다른 부분에 결합함으로써 degradosome의 구성단백질의 비율을 바꾸고 RNase E의 기능을 기질 특이적으로 방해함으로써, 세포내 유전자 발현조절에 기여한다(4, 12). 이러한 RNA degradosome과 유사한 다단백질 복합체가 *Rhodobacter capsulatus*에서 발견되었으나, 이 복합체에서 PNPase는 존재하지 않는 것으로 알려졌다(6). *E. coli* degradosome과는 그 기능이 다르리라고 추론할 수 있다.

*S. coelicolor*에는 *E. coli* RNase E의 아미노기 부분(아미노산 1-498)과 36% 일치율을 보이는 *rns*라는 유전자가 존재하는데, 이 유전자를 *rne*가 결실된 *E. coli* 균주에서 발현하면 RNase E의 기능을 대체할 수 있으며, 또한 이 유전자의 산물인 RNase ES는 *S. coelicolor* PNPase 동족체인 guanosine pentaphosphate

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-820-5241, Fax: 82-2-822-5241
E-mail: kangseok@cau.ac.kr

synthetase I (GPSI)과 결합한다는 것이 보고되었다(7, 11). 이 두 세균에 존재하는 PNPase 동족체의 RNA 분해특성은 계통적으로 멀리 떨어진 *E. coli*와 *S. coelicolor*에 존재하는 RNA degradosome의 RNA 분해와 가공에 있어서의 기능과 관련이 있을 수 있다. 본 연구에서 이 두 단백질의 RNA 분해에 있어서 생화학적 특성과 *S. coelicolor* RNase ES가 *E. coli* degradosome의 구성단백질 중의 하나인 Ppk와 결합하는지에 대한 실험을 수행하였으며 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

균주의 배양과 단백질 정제

RNase ES를 과발현하는 *S. coelicolor* A3 (2)와 GPSI를 과발현하는 *E. coli* BL21(DE3)의 배양과 GPSI의 정제는 기존 보고와 동일한 방법(11)으로 수행하였다. *E. coli* PNPase는 Sigma (USA) 회사로부터 구입하였다.

항체침전과 Western 분석

RNase ES의 항체침전과 Western 분석은 RNase ES 또는 M-RNase ES가 과발현된 *S. coelicolor*의 S30 extract를 이용하여, 기존보고와 동일한 방법(11)으로 수행하였다. Ppk에 대한 항체는 Marie-Joelle Virolle 박사(Institut de Gntique et Microbiologie, UniversitParis XI, 91405 Orsay, France)로부터 분양받았다.

RNA 합성과 분해 에세이

poly(A) 염기배열을 3' 말단에 갖거나 갖지 않은 방사능을 함유한 *lacZ* α RNA의 합성과 전기영동은 기존보고와 동일한 방법(9)으로 수행하였다. RNA 분해 에세이는 100 ng의 PNPase 동족체와 2 pmol의 *lacZ* α RNA를 20 μ l의 에세이 용액 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 10 mM K_2HPO_4 , 1 mM ATP, 1 mM DTT]에 섞은 후에 37°C에서 반응시켰으며, 반응 후 2, 5, 10분에 5 μ l의 샘플을 채취하여 5 μ l의 정지 용액(95 % formamide, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 1 mM EDTA)과 섞어서 반응을 정지시켰다.

결과 및 고찰

지난번 보고한 *S. coelicolor*의 RNase ES의 결합 단백질 동정 실험에서 PNPase의 동족체인 GPSI이 RNase ES와 결합하며, RNase ES가 *E. coli* RNA degradosome과 유사한 단백질 복합체를 이룰 가능성을 보여 주었다(11). *E. coli* PNPase와 GPSI은 아미노산 배열이 44% 동일하지만 이 두 단백질이 RNA 분해에 있어서 어떠한 특성을 가지고 있는가에 대한 실험보고는 없었다(7). 이 두 단백질의 RNA 분해특성은 계통적으로 멀리 떨어진 *E. coli*와 *S. coelicolor*에 존재하는 RNA degradosome의 RNA 분해와 가공에 있어서의 기능과 관련이 있을 수 있다. 이러한 이유로 이 두 단백질의 RNA 분해특성을 시험관에서의 RNA 분해 에세이를 통하여 알아보았다. 그림 1에서 보는 바와 같이 *E.*

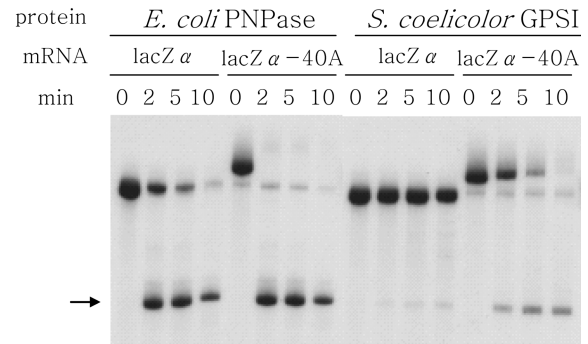


Fig. 1. RNA cleavage properties of *E. coli* PNPase and *S. coelicolor* GPSI. Two pmols of *in vitro* synthesized *lacZ* α or *lacZ* α containing 40 adenosine nucleotides at the 3'-end (*lacZ* α -40A) were incubated with 100 ng of *E. coli* PNPase or *S. coelicolor* GPSI. Samples were taken out at time intervals indicated and analyzed in a 6% acrylamid gel containing 8 M urea. RNA bands of decay intermediates are indicated with an arrow.

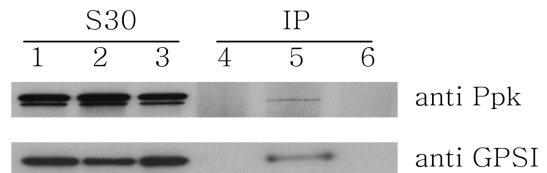


Fig. 2. Co-precipitation of Ppk with RNase ES. C-terminally hexahistidine-tagged RNase ES and its catalytic domain (M-RNase ES) were overexpressed in *S. coelicolor* and immunoprecipitated with monoclonal antibody to the His-tag. S30 cell extracts (lanes 1-3) and immunoprecipitated samples (lanes 4-6) were separated in 6% gradient SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with polyclonal antibodies to Ppk and GPSI. Lanes 1 and 4; *S. coelicolor* plus pJ6021, lanes 2 and 5; *S. coelicolor* plus pRNES301 (RNase ES), lanes 3 and 6; *S. coelicolor* plus pRNES304 (M-RNase ES).

coli PNPase와 GPSI은 *lacZ* α RNA를 분해하여 비슷한 크기의 분해 중간산물을 생산하였으며, 이는 두 효소가 비슷한 정도의 RNA 분해 진행능력(processivity)을 가지고 있음을 시사한다. 또한 *E. coli* PNPase는 poly(A) 염기배열을 3' 말단에 가진 RNA를 더 효과적으로 분해하는 것으로 알려져 있는데, 이번 실험에 사용된 poly(A) 염기배열을 3' 말단에 가진 *lacZ* α RNA 역시 *E. coli* PNPase에 의해 더 효과적으로 분해하는 것을 관찰하였다. 이러한 3' 말단에 존재하는 poly(A) 염기배열에 의한 *E. coli* PNPase의 효소활성 현상이 GPSI을 이용한 RNA 분해에세이에서도 관찰되었다. 이러한 실험결과는 *E. coli* PNPase와 GPSI은 유사한 기능과 특성을 가진 리보핵산의부분해효소임을 시사한다.

RNase ES에 의해 형성되는 RNA degradosome이 *E. coli* degradosome과 같이 GPSI 이외에 다른 구성단백질도 포함하고 있는가를 알아보기 위하여, *E. coli* degradosome 구성단백질 중의 하나인 Ppk와 RNase ES 사이의 결합여부를 항체침전을 통하여 알아보았다. Ppk 또한 전체 아미노산 배열을 포함한(full-

length) RNase ES와 결합하여 침전되었고, GPSI과 같이 RNase ES의 효소활성 도메인(catalytic domain)만을 가진 단백질인 M-Rns와는 결합하지 않았다(Fig. 2). 이 실험결과는 RNase ES가 효소활성 도메인외의 구조적 역할을 하는 도메인(scaffold domain)을 통하여 Ppk와 GPSI과 결합하며, *E. coli* degradosome과 같이 다수의 단백질로 이루어진 RNA degradosome을 형성할 가능성을 제시한다.

위의 실험 결과를 바탕으로 *E. coli*와는 계통적으로 멀리 떨어진 *S. coelicolor*에도 그 기능과 구조가 *E. coli* degradosome과 유사한 다단백질 복합체가 RNase ES에 의해 형성될 수 있으며, RNA degradosome이 원핵생물에서 RNA 분해와 가공에 중심적인 역할을 하며 진화적으로 보존되어 있음을 추론할 수 있다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Apirion, D. and A.B. Lassar. 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* 253, 1738-1742.
2. Carpousis, A.J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, and H.M. Krisch. 1994. Copurification of *E. coli* RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76, 889-900.
3. Condon, C., J. Rourera, D. Brechemier-Baey, and H. Putzer. 2002. Ribonuclease M5 has few, if any, mRNA substrates in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 2845-2849.
4. Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C.J. Moore, S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2006. Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol. Microbiol.* 61, 394-406.
5. Gurevitz, M. and D. Apirion. 1983. Interplay among processing and degradative enzymes and a precursor ribonucleic acid in the selective maturation and maintenance of ribonucleic acid molecules. *Biochemistry* 22, 4000-4005.
6. Jger, S., O. Fuhrmann, C. Heck, M. Hebermehl, E. Schiltz, R. Rauhut, and G. Klug. 2001. An mRNA degrading complex in *Rhodospirillum rubrum*. *Nucleic Acids Res.* 29, 4581-4588.
7. Jones, G.H. and M.J. Bibb. 1996. Guanosine pentaphosphate synthetase from *Streptomyces antibioticus* is also a polynucleotide phosphorylase. *J. Bacteriol.* 178, 4281-8.
8. Kim, S., H. Kim, I. Park, and Y. Lee. 1996. Mutational analysis of RNA structures and sequences postulated to affect 3' processing of M1 RNA, the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. *J. Biol. Chem.* 271, 19330-19337.
9. Lee, K. and S.N. Cohen. 2001. Effect of 3' terminus modifications on mRNA functional decay during in vitro protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 23268-23274.
10. Lee, K., J.A. Bernstein, and S.N. Cohen. 2002. RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 43, 1445-1456.
11. Lee, K. and S.N. Cohen. 2003. A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol. Microbiol.* 48, 349-360.
12. Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qui, Y. Feng, R. Meganathan, S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2003. RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell.* 114, 623-634.
13. Leroy, A., N.F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus, and A.J. Carpousis. 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* 45, 1231-1243.
14. Li, Z., S. Pandit, and M.P. Deutscher. 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18, 2878-2885.
15. Liou, G.G., W.N. Jane, S.N. Cohen, N.S. Lin, and S. Lin-Chao. 2001. RNA degradosome exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 63-68.
16. McDowall, K.J. and S.N. Cohen. 1996. The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* 255, 349-355.
17. Miczak, A., V.R. Kabardin, C.L. Wei, and S. Lin-Chao. 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3865-3869.
18. Morita, T., H. Kawamoto, T. Mizota, T. Inada, and H. Aiba. 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54, 1063-1075.
19. Py, B., C.F. Higgins, H.M. Krisch, and A.J. Carpousis. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381, 169-172.
20. Vanzo, N.F., Y.S. Li, B. Py, E. Blem, C.F. Higgins, L.C. Raynal, H.M. Krisch, and A.J. Carpousis. 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* 12, 2770-2781.

(Received March 13, 2007/Accepted March 27, 2007)

ABSTRACT: Identification and Functional Analysis of Proteins Interacting with *Streptomyces coelicolor* RNase ES

Jong-Myung Kim, Woo-seok Song, Hyun-Lee Kim, Hayoung Go, and Kangseok Lee*
(Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea)

Using co-immunoprecipitation, we identified proteins interacting with *Streptomyces coelicolor* RNase ES, an ortholog of *Escherichia coli* RNase E that plays a major role in RNA decay and processing. Polyphosphate kinase and a homolog of exoribonuclease polynucleotide phosphorylase, guanosine pentaphosphate synthetase I that use inorganic phosphate were co-precipitated with RNase E, indicating a possibility of *S. coelicolor* RNase ES to form a multiprotein complex called degradosome, which has been shown to be formed by RNase E in *E. coli*. Polynucleotide phosphorylase proteins from these two phylogenetically distantly related bacteria species showed similar RNA cleavage action *in vitro*. These results imply the ability of RNase ES to form a multiprotein complex that has structurally and functionally similar to that of *E. coli* degradosome.