

*Streptomyces coelicolor*의 RraA 동족체인 RraAS2에 의한 *Escherichia coli* RNase E 활성조절

안상미 · 신은경 · 염지현 · 이강석*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

최근 *Escherichia coli*에서 RNA의 분해와 가공과정에 중추적인 역할을 하는 리보핵산내부분해효소인 RNase E의 효소활성을 조절하는 단백질 조절자인 RraA가 밝혀졌으며, 이 단백질은 *E. coli* RNase E의 효소활성 부위와 36%의 유사성을 가지는, *Streptomyces coelicolor* RNase ES의 효소활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. *S. coelicolor*의 유전체에는 RraA와 아미노산 서열이 35.4% 이상 유사한 단백질을 코딩하는 유전자가 두 개 존재하는데, 그 중 하나인 *rraAS2*를 클로닝하여 *E. coli* RNase E의 효소활성을 조절하는지를 알아보았다. 그 결과 세포 내에서 RraAS2를 발현시키면 RNase E의 과발현에 의해 저해된 세포의 성장을 RraA와 같이 효과적으로는 아니지만, 어느 정도 복원시키는 것을 확인하였다. 또한 RraAS2가 발현됨으로서 RNase E의 과발현에 의해 증가된 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수를 14% 감소시키는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 RraAS2가 RNase E의 RNA I 분자에 대한 효소 활성을 저해하는 능력을 가지고 있음을 시사한다. 동일한 배양조건에서 *E. coli* 세포내에서의 RNase E에 대한 RraAS2의 상대적인 발현양이 RraA에 비해 6.2배 낮은 것을 확인하였고, 이로 인해 RraAS2가 RNase E의 과발현에 의한 세포 성장의 저해를 복원하는데 필요한 모든 RNA의 가공과 분해속도를 효과적으로 조절하지는 못한다는 것을 추론할 수 있다.

Key words □ ColE1-type plasmid, RraA, RraAS2, RNase E, RNase ES

세포 내에서 유전자 발현은 RNA의 안정성(stability)과 성숙(maturation) 속도에 따라 조절될 수 있다. 특히 mRNA의 분해와 가공에 있어서 중요한 역할을 하는 리보핵산내부분해효소는 RNase E로 알려져 있으며 이는 *E. coli*에서 없어서는 안 될 필수적인 효소이다(1, 4, 14). RNase E는 단일 가닥 RNA의 AU 염기가 많이 존재하는 부분을 선별적으로 절단하여 다양한 mRNA의 분해가 일어나게 하고, 많은 종류의 RNA들의 가공이 일어나게 한다(9, 22, 26, 31). 특히 tRNA, 16S rRNA 그리고 RNase P를 구성하는 M1 RNA등과 같은 non-coding RNA를 가공하는데도 기여를 할뿐만 아니라 특정 플라스미드 DNA의 합성을 조절하기도 한다(7, 8, 12, 13, 17, 18). 이렇게 대장균에 있어서 필수적인 RNase E는 1,061개의 아미노산으로 구성되며 그 구조와 기능에 따라 크게 세 가지 도메인으로 구분할 수 있다. RNase E의 아미노기 말단 부분은 RNase E의 효소적인 활성을 가지는 부분으로 RNA의 특정 부분을 인식해서 절단하는 기능을 가지며, 이 부분만을 가지고도 세포의 생존이 가능하다(23). 최근 RNase E의 구조에 대한 연구가 활발히 진행되면서 RNase E의 효소 부분이 RNase H, S1, 5' sensor, DNase I, Zn 그리고 Small 도메인으로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌다(2). 카르복실기 부분은 아르기닌(arginine)을 많이 포함하는 RNA-결합 부분과 degradosome을 형성하는 부분으로 구성되어 있는데(29), 이는 다단백질

복합체로써 리보핵산외부분해효소(exoribonuclease)인 polynucleotide phosphorylase (PNPase), RhlB RNA helicase, enolase, polyphosphate kinase (PpK), poly(A) polymerase (PAP), GroEL, DnaK 등으로 구성되어 있다(3, 16, 21, 24, 28, 30). RNA helicase는 PNPase의 효소작용이 진행될 때 방해가 되는 hairpin 구조와 같은 RNA의 2차 구조를 풀어주는 역할을 하며, Enolase는 당대사와 관련된 mRNA 분해에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(25, 27).

세포 내에서 RNase E는 자기 자신의 mRNA를 직접 분해함으로써 단백질 합성을 스스로 조절하고 이로서 안정된 수준의 발현 양을 항상 유지할 수 있다(10, 27). 또한 최근 RNase E의 단백질 저해제로 알려진 RraA (Regulator of ribonuclease activity A)가 RNase E에 결합함으로써 대장균 내에서의 RNase E의 효소 활성을 조절할 수 있다는 것이 밝혀졌다(15). 세포 내에서 RNase E가 과발현될 경우 세포의 성장은 저해되게 되는데, RraA가 같이 발현될 경우 RraA가 RNase E의 효소 활성을 저해시킴으로써 정제되었던 세포의 성장을 다시 회복시킬 수 있다(32). 또한 *S. coelicolor*에는 *E. coli* RNase E의 아미노기 부분과 34.7% 유사성을 가지는 RNase ES가 존재하는데, 이를 *E. coli*의 RNase E 유전자인 *rne*가 결실된 *E. coli* 균주에서 발현시키면 RNase E의 기능을 대체할 수 있으며(14), RraA 또한 RNase ES의 효소활성을 제어할 수 있는 것으로 알려져 있다(33, 34).

*S. coelicolor*의 유전체에는 *E. coli*의 RraA와 아미노산 서열이 35.4% 이상 유사한 단백질을 코딩하는 유전자가 두 개 존재하는데

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

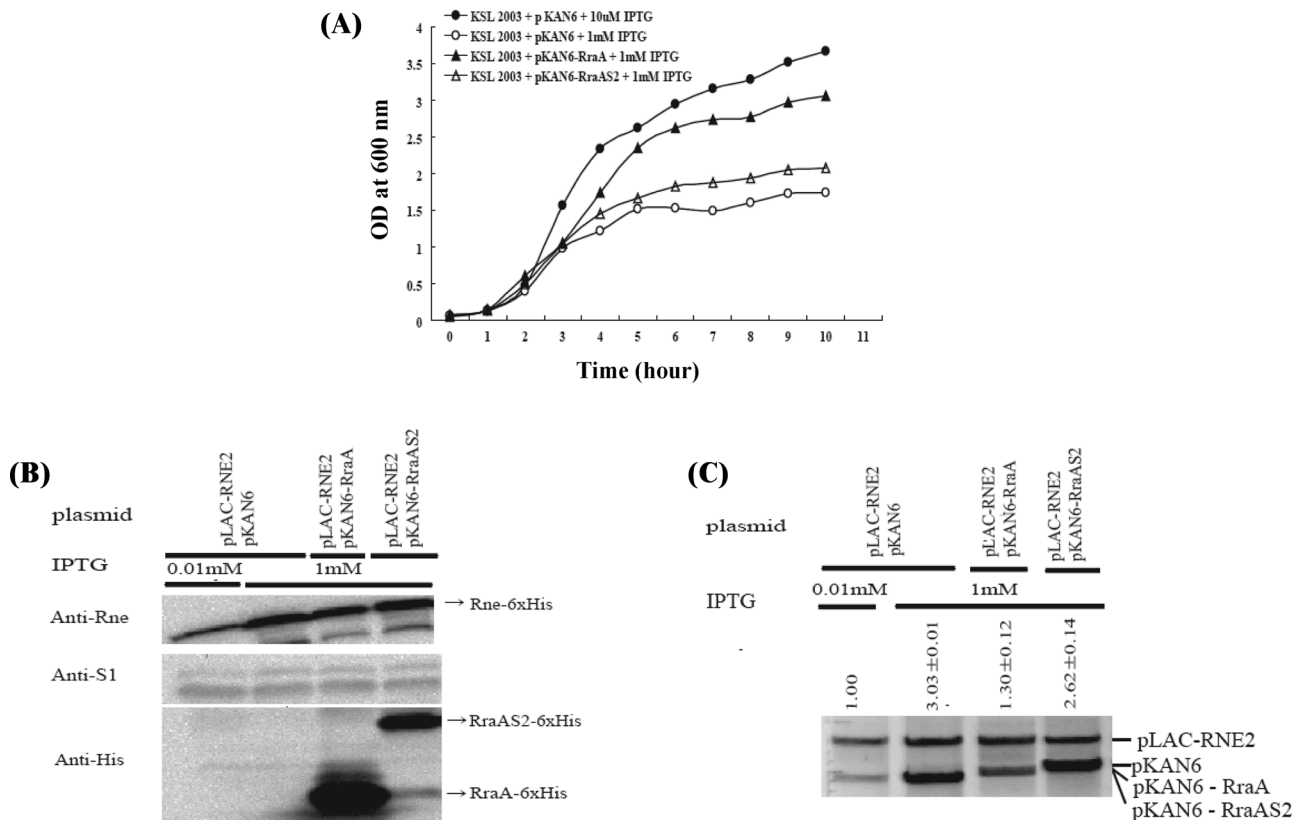


Fig. 2. Effects of co-expression of RraAS2 on RNase E activity (A) Effects of co-expression of RraAS2 in *E. coli* cells overproducing RNase E on growth. The cultures of KSL2003 cells harboring pKAN6, pKAN6-RraA, or pKAN6-RraAS2 were grown in LB-10 μ M IPTG, 0.2% arabinose and no additional IPTG (KSL2003+pKAN6+10 μ M IPTG) or 1 mM IPTG (KSL2003+pKAN6-RraA+1 mM IPTG and KSL2003+pKAN6-RraAS2+1 mM IPTG) was added to the cultures at $OD_{600}=0.1$. And growth was monitored by analyzing cell density at time intervals. (B) Western blot analysis of cultures obtained from the growth curve. Culture samples from Fig. 2A were harvested in log phase ($OD_{600}=0.7$) to obtain total protein. The same membrane probed with anti-Histidine monoclonal antibody was stripped and reprobed with anti-S1 polyclonal antibody. The S1 antibody used to provide an internal standard to evaluate the amount of cell extract in different lanes. (C) Effects of over-production of RNase E and co-expression of RraAS2 on copy number of ColE1-type plasmid. Densitometric measurements of bands corresponding to each plasmid were converted to actual ratios after normalizing the values according to the size of ColE1-type plasmids and are shown on the top of the gel.

RraAS2 플라스미드를 KSL2003 균주 내로 삽입하여 형질전환하였다. 이 플라스미드는 kanamycin에 저항성을 가지고 있으며 RraAS2 발현 정도는 아라비노스 프로모터(PBAD)에 의하여 조절된다. 이미 알려진 바와 같이, 1 mM IPTG와 0.2% 아라비노스가 포함된 배지에서 세포를 배양하여 Rne와 RraA 두 단백질을 동시에 과발현 시켰을 때와, RraA를 발현시키지 않는 공 벡터(pKAN6)만을 발현 시켰을 때의 세포의 성장속도를 비교해보면 과발현된 RNase E에 의해 저해된 세포의 성장을 RraA가 동시에 과발현함으로써 세포의 생장이 정상수준으로 회복시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). RraA와는 달리 RraAS2를 같은 배지에서 과발현 시켰을 때는 RraA만큼 효과적이지 않지만, Rne만을 과발현시켰을 때와 비교하면 어느 정도 세포의 성장을 복원시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 세포 내에서 RraA와 RraAS2가 정상적으로 발현되는 것을 알아보기 위하여, C-말단에 히스티딘-tag을 포함한 RraA (RraA-His)와 RraAS2 (RraAS2-His)를 각각 같은 조건에서 KSL2003 세포에서 발현시켜서 항His-

tag 항체를 이용한 western blot 분석을 통해서 확인하였다(Fig. 2B). 그 결과 항His 항체가 RraA-His와 RraAS2-His에 같은 비율로 결합한다고 생각하고 각각의 분자량을 고려해 보았을 때, 세포내에서 RraAS2-His가 RraA-His에 비하여 4.2배 정도 적게 발현된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 과발현된 RNase E에 의해 저해된 세포의 성장을 복구시키는 RraA의 발현량을 보면 과발현된 RNase E 양에 비해 RraA는 33.1배 정도 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 같은 방법으로 RraAS2의 발현량을 보면 과발현된 RNase E 양에 비해 5.3배 정도 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. RraA-His는 세포의 성장이나 RNase E의 효소활성 저해에서 RraA와 같은 표현형을 보였으며, RraAS2-His는 세포의 성장에서 RraAS2와 같은 표현형을 보였다(자료 미제시).

대장균에서 RNase E는 ColE1-타입 플라스미드 DNA의 복제를 조절하는 안티센스 조절자인 RNA I을 특이적으로 절단함으로써 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수를 조절하는 것으로 알려져 있으며(20), 이러한 원리를 이용하여 세포 내에서 RraAS2가

RNase E의 효소 활성에 어떻게 영향을 미치는지를 확인해 보았다. 이를 위하여 RNase E가 과발현된 상태에서 RraAS2를 함께 발현시킨 후 플라스미드(pKAN6-RraAS2)의 복제 수(copy number)를 비교하여 보았다(Fig. 2C). 1 mM IPTG가 포함된 배지에서 세포를 배양하면 과발현된 Rne에 의해 ColE1-타입 플라스미드인 pKAN6의 복제 수가 10 μ M IPTG가 포함되었을 때에 비해 약 3 배 정도 증가함을 관찰 할 수 있었다. 그리고 1 mM IPTG와 0.2% arabinose가 포함된 배지에서 RNase E와 RraA를 함께 발현시켰을 때의 플라스미드 복제수는 정상적인 세포에서의 플라스미드 복제 수와 비슷한 수준으로 감소함을 관찰할 수 있었다. 그러나 KSL2003 세포에서 RNase E와 RraAS2를 동시에 과발현 시켰을 때를 보면 각각의 플라스미드의 사이즈를 고려해 볼 때 RNase E만 과발현 시켰을 때에 비해 복제 수가 약 14% 감소함을 관찰하였다. 이러한 실험 결과를 통해 RNase E가 과발현된 KSL2003 균주에서 RraAS2를 함께 발현 시키면 RNase E의 RNA I에 대한 효소 활성을 어느 정도 감소 시켜 결과적으로 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수를 감소시킨다는 것을 유추할 수 있다.

RNA의 분해와 가공에 있어서 RNase E의 기능에 대한 연구는 지난 수십년간 계속되어 왔다. 그러나 RNase E의 효소 활성을 어떻게 조절하는지에 관한 구체적인 기작에 대한 연구는 아직도 정확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 최근에 RNase E의 단백질 저해제라고 알려진 RraA의 *S. coelicolor* 동족체인 RraAS2가 세포 내에서 RNase E의 효소 활성에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 그 결과 RNase E와 RraAS2가 1:5.3의 농도비율로 세포 내에서 발현되었을 때, RraAS2가 RNase E의 RNA I에 대한 효소 활성을 약 14% 저해시켰으며, RraAS2가 RNase E의 과발현에 의한 세포의 성장 저해를 RraA 만큼 효과적이지는 않으나, 어느 정도 복원시키는 것을 관찰하였다. *E. coli* 세포 내에서 RNase E에 대한 RraA2의 상대적인 발현양이 RraA 보다 6.2배 가량 낮은 것을 감안하면, RraAS2가 RNase E의 효소활성을 저해한다고 추정할 수 있다. 앞으로 *S. coelicolor* 내에서 직접 RNase E에 대한 RraAS2의 역할을 확인해 보는 실험을 수행할 예정이며, 이러한 연구를 통해 세균 내에서 RNase E 동족체의 효소 활성이 어떻게 조절되는지에 관한 기작을 밝히는 데 도움을 줄 것으로 기대한다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 중앙대학교 우수연구자연구비 및 교육과학기술부 21C 프론티어 미생물 유전체 활용기술 개발사업의 지원으로 수행하였습니다. 본 논문에 서술된 내용은 상기 사업에서 지원받아 수행한 연구결과이며 이에 감사드립니다.

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. Callaghan, A.J., M.J. Marcaida, J.A. Stead, K.J. McDowall, W.G. Scott, and B.F. Luisi. 2005. Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* 437, 1187-1191.
3. Carpousis, A.J., G.V. Houwe, C. Ehretsmann, and H.M. Krisch. 1994. Co-purification 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.
4. 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.
5. Feng, Y., H. Huang, J. Liao, and S.N. Cohen. 2001. *Escherichia coli* poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. *J. Biol. Chem.* 276, 31651-31656.
6. 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.
7. 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.
8. Gurevitz, M., S.K. Jain, and D. Apirion. 1983. Identification of a precursor molecular for the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4450-4454.
9. Huang, H., J. Liao, and S.N. Cohen. 1998. Poly(A)- and poly(U)-specific RNA 3'tail shortening by *E. coli* ribonuclease E. *Nature* 391, 99-102.
10. Jain, C. and J.G. Belasco. 1995. RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev.* 9, 84-96.
11. Kalapos, M.P., H. Paulus, and N. Sarkara. 1997. Identification of ribosomal protein S1 as a poly(A) binding protein in *Escherichia coli*. *Biochimie* 79, 493-502.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, 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.
16. 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.
17. Li, Z. and M.P. Deutscher. 2002. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* 8, 97-109.
18. 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.
19. Lin-Chao, S. and S.N. Cohen. 1991. The rate of processing and degradation of antisense RNA I regulates the replication of ColE1-type plasmids *in vivo*. *Cell.* 65, 1233-1242.
 20. Lin-Chao, S., T.T. Wong, K.J. McDowall, and S.N. Cohen. 1994. Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J. Biol. Chem.* 269, 10797-10803.
 21. Liou, G.G., W.N. Jane, S.N. Cohen, N.S. Lin, and S. Lin-Chao. 2001. RNA degradosomes 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.
 22. Masse, E., F.E. Escorcia, and S. Gottesman. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 17, 2374-2383.
 23. 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 motif. *J. Mol. Biol.* 255, 349-355.
 24. Miczak, A., V.R. Kaberdin, C.L. Wei, and S. Lin-Chao. 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3865-3869.
 25. 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 phosphor-sugar stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54, 1063-1075.
 26. Morita, T., Y. Mochizuki, and H. Aiba. 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small non-coding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4858-4863.
 27. Mudd, E.A. and C.F. Higgins. 1993. *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E : autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Mol. Microbiol.* 9, 557-568.
 28. 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.
 29. Taraseviciene, L., G.R. Bjork, and B.E. Uhlin. 1995. Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem.* 270, 26391-26398.
 30. Vanzo, N.F., Y.S. Li, B. Py, E. Blum, 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.
 31. Walsh, A.P., M.R. Tock, M.H. Mallen, V.R. Kaberdin, A.V. Gabain, and K.J. McDowall. 2001. Cleavage of poly (A) tails on the 3'-end of RNA by ribonuclease E of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 29, 1864-1871.
 32. 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.
 33. Yeom, J.H., E. Shin, H. Go, S. Sim, and K. Lee. 2008. Functional implications of the conserved action of regulators of ribonuclease activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* Article in press.
 34. Yeom, J.H., H. Go, E. Shin, H.L. Kim, S.H. Han, C.J. Moore, J. Bae, and K. Lee. 2008. Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA. *FEMS Microbiol. Lett.* Article in press.

(Received June 5, 2008/Accepted June 25, 2008)

ABSTRACT : Modulation of *Escherichia coli* RNase E Action by RraAS2, a *Streptomyces coelicolor* Ortholog of RraA

Sangmi Ahn, Eunkyong Shin, Ji-Hyun Yeom, and Kangseok Lee* (Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea)

RraA is a recently discovered protein inhibitor that regulates the enzymatic activity of RNase E, which plays a major role in the decay and processing of RNAs in *Escherichia coli*. It has also been shown to regulate the activity of RNase ES, a functional *Streptomyces coelicolor* ortholog of RNase E, which has 36% identity to the amino-terminal region of RNase E. There are two open reading frames in *S. coelicolor* genome that can potentially encode proteins having more than 35.4% similarity to the amino acid sequence of RraA. DNA fragment encoding one of these RraA orthologs, designated as RraAS2 here, was amplified and cloned in to *E. coli* vector to test whether it has ability to regulate RNase E activity in *E. coli* cells. Co-expression of RraAS2 partially rescued *E. coli* cells over-producing RNase E from growth arrest, although not as efficiently as RraA, induced by the increased ribonucleolytic activity in the cells. The copy number of ColE1-type plasmid in these cells was also decreased by 14% compared to that in cells over-producing RNase E only, indicating the ability of RraAS2 to inhibit RNase E action on RNA I. We observed that the expression level of RraAS2 was lower than that of RraA by 4.2 folds under the same culture condition, suggesting that because of inefficient expression of RraAS2 in *E. coli* cells, co-expression of RraAS2 was not efficiently able to inhibit RNase E activity to the level for proper processing and decay of all RNA species that is required to restore normal cellular growth to the cells over-producing RNase E.