

Escherichia coli 16S rRNA의 789 염기의 기능분석 및 이차복귀돌연변이체 발체를 위한 방법 개발

김종명 · 고하영 · 송우석 · 류상미 · 이강석*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

Escherichia coli 16S rRNA의 잘 보존된 부분인 790 loop의 즉흥진화를 통한 분석에서 리보솜의 단백질 수행기능을 위해서 필수불가결한 것으로 추측되는 789번 위치에 염기치환을 유발하여 제작한 변이체 리보솜의 기능을 chloramphenicol acetyltransferase mRNA의 단백질로의 번역능력 차이에 따른 chloramphenicol에 대한 저항성의 정도를 측정함으로써 분석하였다. 예상했던 바와 같이 모든 변이체 리보솜의 단백질 합성능력은 현저히 저하되었으며, 789 염기의 단백질합성에서의 기능을 규명하기 위하여 16S rRNA 변이체의 기능을 회복시키는 이차복귀돌연변이(second-site revertant)를 발체하는 효과적인 유전학적 실험방법을 개발하였다.

Key words □ 790 loop, instant evolution, rRNA, ribosome

1980년대까지 rRNA는 단지 단백질들이 달라붙을 수 있는 뼈대만 여겨졌으나 효소기능을 가진 RNA의 발견이후(3) 단백질 합성에 있어서 rRNA의 효소로서의 기능에 대한 연구가 활발하게 진행되었다. 최근에는 rRNA가 단백질 합성의 모든 세부적인 활성기작에 직접적으로 관여한다는 실험 증거들이 많이 발표되었다(2, 4, 5, 11, 16).

rRNA의 구조와 기능에 대한 연구는 *Escherichia coli*를 이용하는데 있어서의 여러 가지 편리함 때문에 오랫동안 이 생물체에서 수행되었다. 그동안 이 분야에 괄목할만한 연구 성과가 있었음에도 불구하고 rRNA의 염기변형을 통한 유전학적 기능분석을 하는 데는 많은 구조적인 문제들이 있었다. 무엇보다도 rRNA를 코딩하는 유전자가 보통은 한 세포에 여러 개 존재하고(*E. coli*에는 7개 rRNA 오페론이 있다), 대부분의 rRNA의 염기 변형은 단백질합성에 치명적인 영향을 주어 세포를 잘 자라지 않게 하거나 죽인다. 이러한 문제점들을 극복하기위한 많은 시도들이 있었으나 정상적인 유전학적 방법들을 이용할 수 없는 단백질합성기작의 특수성 때문에 이 분야에서의 큰 발전은 없었다.

rRNA의 기능을 유전학적으로 연구하는데 있어서의 가장 큰 문제점은 세포의 정상적인 기능을 저해하지 않으면서 단백질합성에 영향을 미치는 rRNA 염기변형을 직접적으로 발체(selection)할 수 있는 효과적인 유전학적 방법이 없는 것이다. 최근에 본 연구자는 16S rRNA의 기능을 *in vivo*에서 유전학적으로 분석할 수 있는 시스템을 개발하였다(10-12). 이 시스템에서는 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) mRNA가 pRNA122 플라스미드에서 기원한 30S에 의해서만 인지되어 해독되며 세포

내 다른 mRNA는 이 30S에 의해서 해독되지 않는다. 이 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli*는 chloramphenicol에 저항성이 있으며 그 저항성 정도는 이 플라스미드에서 기원한 30S 몸체가 얼마나 많은 CAT 단백질을 합성하는가에 달렸다. 이 시스템을 이용하여 16S의 가장 잘 보존된 부분에 대한 많은 즉흥진화(instant evolution) 실험이 진행되었고(11-17), 이로 인해 16S의 기능과 구조에 대한 유전학적 해석이 가능하게 되었다. 이 시스템을 이용하여 소단위체 rRNA의 가장 잘 보존된 염기의 변형이 리보솜의 기능에 미치는 영향을 분석하고 이차복귀돌연변이(second-site revertant)를 발체하는 실험방법을 개발하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

균주의 배양과 최소억제농도의 측정

모든 플라스미드는 *E. coli* DH5 (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*)에서 유지하였으며 ampicillin (100 µg/ml)을 함유한 LB 배지에서 배양하였다. pRNA122 플라스미드의 lacUV5 프로모터에서 rRNA 합성을 유발하기 위해서 1 mM IPTG가 사용되었다. 최소억제농도(minimal inhibitory concentration)를 측정하기 위해서는 하룻밤 배양한 세포를 1:100으로 희석시켜 2시간 배양한 뒤에 IPTG를 첨가하여 2~3시간 더 배양한 후, 약 10⁴개의 세포를 여러 농도의 chloramphenicol (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml)을 포함한 LB배지에 접종하여 24시간 동안 배양하여 세포의 성장을 완전히 억제하는 최소한의 chloramphenicol 농도를 결정하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-820-5241, Fax: 02-822-5241
E-mail: kangseok@cau.ac.kr

플라스미드의 제작과 PCR을 이용한 염기치환

pRNA122와 p16ST122의 제작은 보고된 바와 같고(10, 12) pASS2 플라스미드는 p16ST122의 *lacI^r* 유전자에 존재하는 *BclI*와 *BstEII* 제한효소 자리에 잠재성 돌연변이를 재조합 PCR 방법을 이용해 삽입함으로써 제한효소 인식부위를 제거하여, 대부분(약 95%)의 16S rRNA를 코딩하는 부분을 PCR DNA로 클로닝할 수 있게 제작하였다. 16S rRNA를 코딩하는 부분의 789 위치에 염기치환을 포함한 리보솜을 발현하는 클론을 제작하기 위하여, 이 부분에 염기치환을 포함한 PCR DNA를 *BglII*와 *DraIII* 제한효소로 분해하여 pRNA122 플라스미드의 같은 제한효소 자리에 클론하였다. PCR DNA를 증폭시키기 위해 사용한 primer는 16S-537F (5'-GGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA), 16S-786R (5'-CCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCG), 16S-791H (5'-CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATVAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA)와 ASD-B (5'-GGCGACTTCTACTCACAAAC)이며 재조합 PCR 방법(9)을 사용하였다. 16S rRNA에 무작위로 염기치환을 일으키기 위해서 PCR 반응에 0.1~0.3 mM MnCl₂를 첨가하였다. PCR kit는 Perkin Elmer에서 구매하였으며, 100 µl의 PCR 반응에는 1X PCR buffer II, 2.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 1 µM primers, 2.5 unit의 AmpliTaq DNA 중합효소와 15 ng의 pRNA122 플라스미드가 포함되었으며 반응조건은 94°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 90초의 주기로 30번을 반복하였다. 사용되었던 primer는 16S-1F (5'-AAATTGAAGAGTTTGATCA)와 16S-1542R (5'-TAATCCATGATCCAACCGCAGGTTCCCCTACGGTTACC)이었다.

결과 및 고찰

소단위체 rRNA의 가장 잘 보존된 부분 중의 하나인 790 loop (1, 8) 상의 염기에 대한 연구는 많이 수행되었으나(6, 11, 13-15, 18) 이 부분이 정확하게 단백질 합성과정에서 어떤 기능을 수행하는지에 대한 연구결과는 보고된 바 없다(Fig. 1). 지난번 보고한 790에 대한 증후진화 실험결과에서 *E. coli* 16S rRNA의 789와 791 염기가 리보솜의 기능을 위해서 필수적일 수 있다는 가설을 얻을 수 있었다(11). 이 사실을 근거로 하여, pRNA122 플라스미드의 16S rRNA 코딩부분의 789 위치에 염기치환을 만들어, 변형된 리보솜의 기능을 chloramphenicol (Cm)에 대한 저항성으로 측정함으로써 789 염기가 리보솜의 기능에 미치는 영향을 측정하였다. 예상했던 바와 같이, 789 위치에서의 염기변형은 리보솜의 기능을 급격히 저하시켰으며, 모든 변이체 리보솜 중에서 U에서 C로의 치환을 포함한 리보솜이 가장 높은 단백질 합성기능을 보였으며, 이 변이체 리보솜을 발현하는 *E. coli* 세포의 Cm에 대한 최소억제농도는 600 µg/ml에서 300 µg/ml로 감소하였다(그림 1C). U에서 A 또는 G로의 염기치환을 포함한 변이체 리보솜을 발현하는 *E. coli* 세포의 Cm에 대한 최소억제농도는 600 µg/ml에서 50-75 µg/ml로 감소되어, 789 염기의 교차형 변이(transversion)가 리보솜의 단백질 합성기능을 상대적으로 더욱 저하시킴을 보였다. 이 결과는 789 염기가 리보솜의 단백질 합

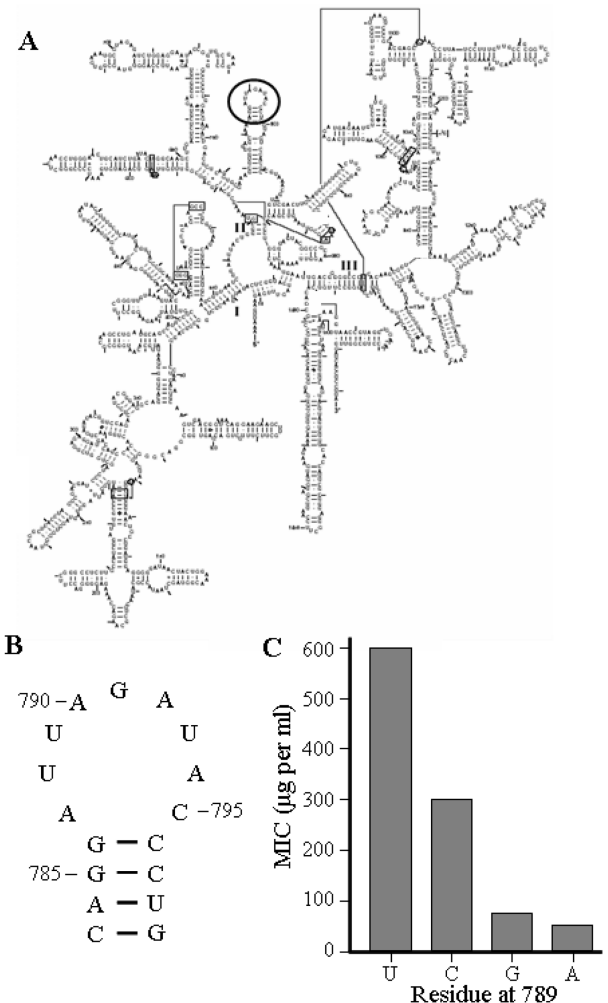


Fig. 1. (A) A secondary structure of *E. coli* 16S rRNA. The location of the 790 loop is indicated with a circle. (B) The secondary structure of the 790 loop. (C) Effect of mutations at the position 789 on ribosome function. Degree of resistance to Cm by *E. coli* cells expressing pRNA122 ribosomes containing a base substitution at the position 789 was measured.

성 수행능력에 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다.

이 변이체 리보솜이 단백질합성과정의 어느 특정단계에서의 기능 또는 그 기능을 수행하는데 필요한 구조를 상실했는지를 유전학적으로 규명하기 위하여, 이 변이체의 기능을 회복시키는 16S rRNA 상의 이차복귀돌연변이(second-site revertant)를 발취하는 실험방법을 개발하였다. 먼저, 16S rRNA의 코딩부분만 무작위로 염기치환을 일으켜서 클론할 수 있는 플라스미드(pASS2)를 제작하였다. 이 플라스미드는 pUC19에서 유래되었으며, pRNA122 플라스미드보다 한 세포당 플라스미드의 수가 많아 pASS2를 갖고 있는 *E. coli* 세포는 Cm에 대한 최소억제농도가 700 µg/ml이다. 다음으로 PCR을 통해 증폭한 16S rRNA를 코딩하는 DNA 분자 한 개당 평균 하나의 염기치환이 무작위로 들어갈 수 있는 PCR 반응의 조건을 설정하기 위하여, Taq DNA

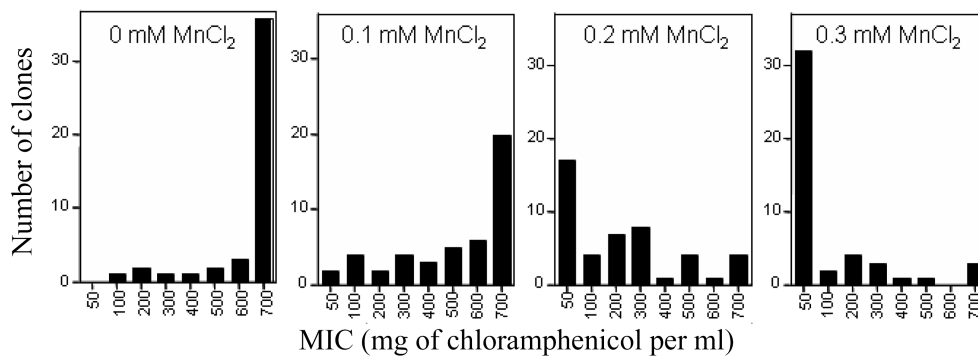


Fig. 2. Mutagenesis of 16S rRNA coding region by error-prone PCR. Coding region of 16S rRNA was amplified using error-prone PCR with different concentrations of MnCl_2 and cloned into pASS2. MIC was measured by choosing forty eight clones from each group were tested for degree of resistance to Cm.

중합효소의 중합반응과정에서 염기치환을 유발시키는 것으로 알려진 Mn^{2+} 을 PCR 반응에 여러 농도로 포함하여 DNA를 증폭하고 pASS2 플라스미드에 클론하여 이 클론들의 Cm에 대한 저항성을 측정하였다(7). Fig. 2에서 보는 바와 같이 PCR 반응에 포함된 Mn^{2+} 의 농도가 0에서 0.3 mM로 증가함에 따라, PCR DNA가 삽입된 pASS2 플라스미드를 가진 *E. coli* 세포의 Cm에 대한 저항성이 감소함을 관찰하였다. 이 결과로 16S rRNA의 코딩부분이 Mn^{2+} 농도에 따라서 염기치환이 유발되었음을 알 수 있었다. 하나의 PCR DNA 분자 당 평균 염기치환 수를 알아보기 위하여 0.1 mM Mn^{2+} 을 포함한 반응에서 얻은 PCR DNA를 간직한 20개 클론들의 염기배열을 분석하였다. 전체 1,542 뉴클레오타이드의 16S rRNA 코딩부분의 ~90%에 해당하는 부분을 분석

한 결과, 하나의 클론에 0~3개의 염기치환이 일어났음을 알 수 있었다(Table 1). 이 결과를 이용하여, 789 위치에 염기치환을 가지고 있는 변이체 리보솜의 단백질 합성 기능을 회복시키는 이차복귀돌연변이(second-site revertant)를 발체하는 실험을 수행 중에 있으며, 발체된 이차복귀돌연변이는 789 염기가 단백질 합성 과정에서 16S rRNA의 어떤 다른 부분과 결합을 하는지, 그러한 결합으로 이루어지는 구조의 기능이 무엇인지 등에 관한 구체적인 단백질 합성기작 연구에 도움이 될 것으로 기대한다.

감사의 말

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

Table 1. Sequence analysis of the mutant clones

| Clone | Mutations | MIC |
|-------|----------------------|-----|
| 1 | C525A, T692C, A913T | 50 |
| 2 | A629G, A825G, A1250G | 50 |
| 3 | T701C | 100 |
| 4 | G1220A | 100 |
| 5 | G1058T | 200 |
| 6 | C528T, C689T, G971A | 200 |
| 7 | G111C | 300 |
| 8 | C418T, T636A, T772C | 300 |
| 9 | T96C, A162G | 400 |
| 10 | T471C | 400 |
| 11 | n.d. ^a | 500 |
| 12 | n.d. ^a | 500 |
| 13 | T118C, A1503G | 500 |
| 14 | A1036G | 600 |
| 15 | n.d. ^a | 600 |
| 16 | T594C, C483T | 600 |
| 17 | n.d. ^a | 700 |
| 18 | n.d. ^a | 700 |
| 19 | G761C | 700 |
| 20 | n.d. ^a | 700 |

^an.d., not determined

참고문헌

1. Cannone, J. J., S. Subramanian, M.N. Schnare, J. R. Collett, L.M. D'Souza, Y. Du, B. Feng, N. Lin, L.V. Madabusi, K.M. Muller, N. Pande, Z. Shang, N. Yu, and R.R. Gutell. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3, 2.
2. Cate, J.H., M.M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T.N. Earnest, and H. F. Noller. 1999. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285, 2095-2104.
3. Cech, T.R., A.J. Zaug, and P.J. Grabowski. 1981. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487-96.
4. Clemons, W.M. Jr., J.L. May, B.T. Wimberly, J.P. McCutcheon, M. S. Capel, and V. Ramakrishnan. 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400, 833-40.
5. Dahlberg, A.E. 1989. The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell* 57, 525-529.
6. Dinos, G, D.N. Wilson, Y. Teraoka, W. Szaflarski, P. Fucini, D. Kalpaxis, and K.H. Nierhaus. 2004. Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding.

- Mol. Cell.* 13, 113-24.
7. Gram, H., L.A. Marconi, C.F. Barbas 3rd, T.A. Collet, R.A. Lerner, and A. S. Kang. 1992. *In vitro* selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3576-80.
 8. Gutell, R.R., N. Larsen, and C.R. Woese. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10-26.
 9. Higuchi, R. 1989. Using PCR to engineer DNA. p. 61-70. *In* PCR Technology (Erlich, H.A., ed.), Stockton Press, New York.
 10. Lee, K., C.A. Holland-Staley, and P.R. Cunningham. 1996. Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *RNA* 2, 1270-1285.
 11. 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.
 12. Lee, K., C.A. Holland-Staley, and P.R. Cunningham. 2001. Genetic approaches to studying protein synthesis: effects of mutations at Ψ516 and A535 in *Escherichia coli* 16S rRNA. *J. Nutr.* 131, 2994S-3004S.
 13. Moazed, D. and H.F. Noller. 1986. Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* 47, 985-994.
 14. Moazed, D. and H.F. Noller. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327, 389-394.
 15. Moazed, D., R.R. Samaha, C. Gualerzi, and H.F. Noller. 1995. Specific protection of 16 S rRNA by translational initiation factors. *J. Mol. Biol.* 248, 207-210.
 16. Noller, H.F. 1991. Ribosomal RNA and translation. *Ann. Rev. Biochem.* 60, 191-227.
 17. Szatkiewicz, J. P., H. Cho, S.-M. Ryou, J.-M. Kim, P. R. Cunningham, and K. Lee. 2006. Genetic analysis of a structural motif within the conserved 530 stem-loop of *Escherichia coli* 16S rRNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 569-575.
 18. Tappich, W.E., D. J. Goss, and A.E. Dahlberg. 1989. Mutation at position 791 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA affects processes involved in the initiation of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4927-4931.

(Received May 16, 2006/Accepted May 25, 2006)

ABSTRACT : Functional Analysis of the Residue 789 in *Escherichia coli* 16S rRNA and Development of a Method to Select Second-site Revertants

Jong-Myung Kim, Ha-Young Go, Woo-Seok Song, Sang-Mi Ryou, and Kangseok Lee*
(Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul, Korea)

A base substitution was introduced at the position 789 in *Escherichia coli* 16S rRNA, which was previously identified as an invariant residue for ribosome function and the ability of the mutant ribosomes to translate chloramphenicol acetyltransferase mRNA was measured by determining the degree of resistance to chloramphenicol of cells expressing these mutant ribosomes. As expected, mutant ribosomes containing a base substitution at the position 789 showed significantly reduced protein-synthesis ability and to identify a functional role played by this residue in protein synthesis, we developed an efficient genetic method to select second-site revertants in 16S rRNA that restore protein-synthesis function to these mutant ribosomes.