

*Saccharomyces cerevisiae*에서 번역 개시 인자 eIF1A 돌연변이에 대한 분석

권성훈 · 김준호 · 최보경 · 김나연 · 최도희 · 박경준 · 어정현 · 배성호*

인하대학교 자연과학대학 생명과학과

번역 개시 인자 eIF1A는 진핵생물에서 43S preinitiation complex 형성을 비롯한 번역 개시 과정의 여러 단계에서 필수적인 역할을 하며, 잘 보존된 oligonucleotide-binding (OB) fold를 가지고 있는 단백질이다. 본 연구진은 이전 연구에서 eIF1A가 RNA annealing 활성을 가지고 있으며 double-stranded RNA에 결합하여 안정된 복합체를 형성한다는 것을 발견한 바 있다. 본 연구에서는 이러한 활성을 나타내는데 필요한 active site를 찾고, 이러한 활성이 효모의 성장에 필수적인 기능인지를 알아보기 위하여 여러 가지 돌연변이를 제조하였다. N-말단과 C-말단은 제거되었지만 완전한 OB-fold를 가지고 있는 eIF1A(Δ T)는 RNA annealing 활성을 보이는 반면, OB-fold에 돌연변이가 도입된 단백질들은 모두 활성이 사라졌다. 또한, R57D 돌연변이를 제외한 모든 OB-fold 돌연변이는 dsRNA에도 결합하지 않았다. 이러한 결과는 eIF1A의 RNA annealing 활성과 dsRNA 결합에는 완전한 OB-fold domain이 필요하다는 것을 의미한다. 돌연변이들이 효모의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, RNA annealing 활성과 효모의 성장은 뚜렷한 연관성이 없었으며, 적어도 R57D와 K94D 경우에는 돌연변이가 성장하지 못하는 원인이 생체 내 eIF1A 단백질의 안정성과 관계있는 것으로 생각된다.

Key words □ double-stranded RNA, eIF1A, RNA chaperone, *S. cerevisiae*, translation initiation factor

RNA는 생명현상의 여러 과정에서 중요한 조절인자로 작용한다. 특히, tRNA, rRNA, self-splicing group I intron 등과 같은 non-coding RNA는 활성을 나타내기 위해서는 특정한 3차원적 구조로 folding이 일어나야 한다. 그러나 RNA는 정상적인 Watson-Crick base-pairing (AU와 GC pair) 외에 GU base-pair 등 다양한 조합의 base-pairing을 할 수 있기 때문에 RNA 구조 형성을 위해서는 misfolding과 kinetic folding trap을 극복해야 한다(4). 따라서 대부분의 RNA는 *in vivo*에서 단백질의 도움을 받아 구조를 형성한다고 생각되며, 이러한 기능을 하는 단백질들을 RNA chaperone이라 한다(19). RNA chaperone은 정확하게 folding되었지만 구조적으로 불안정한 RNA에 결합하여 안정화시키는 역할을 하거나 unfolded RNA에 결합하여 folding의 핵을 제공하는 종류와, RNA annealing 활성을 가져서 서로 상보적인 염기서열을 가진 RNA 가닥을 결합시켜 folding을 촉진하는 종류가 있다(12). 이러한 단백질들은 RNA의 빠르고 정확한 annealing, strand transfer, strand exchange 등을 촉매함으로써, 전사, 번역, splicing, preRNA export, RNA 분해 등 생체 내 수많은 RNA 대사에 관여한다(15, 18, 21).

진핵세포의 번역개시 과정은 박테리아보다 훨씬 복잡하고, preinitiation complex의 형성, 개시 site 선택 과정 등에서 박테리아와 근본적으로 다르다. 박테리아의 번역개시 과정에는 세 개의 개시 인자, IF1, IF2, IF3가 관여하며, 각각 개시 tRNA (fMet-

tRNA)가 P site에 결합하는 것을 촉진하고, 리보솜 큰 소단위와 작은 소단위의 결합을 도와주며, 개시 site 선택의 정확도를 높여주는 역할을 한다(9). 진핵세포의 개시 인자인 eIF1A와 eIF1은 각각 IF1과 IF3의 기능적/구조적 ortholog들로서 개시 과정의 여러 단계에서 다양한 역할을 한다. eIF1A는 Met-tRNA와 40S 리보솜 소단위의 결합을 안정화시키며, mRNA 결합을 촉진하고, 40S 리보솜 소단위가 미성숙한 상태로 60S 리보솜 소단위에 결합하는 것을 방지한다. 뿐만 아니라 eIF1A는 43S preinitiation complex가 mRNA에서 첫 번째 AUG 코돈을 찾는 것을 촉진하는 역할도 한다(1, 20).

진핵세포의 eIF1A와 박테리아 homolog인 IF1은 5개의 β -strand로 이루어진 매우 잘 보존된 oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB) fold domain을 가지고 있는데(2, 17), 이 부분이 RNA에 결합하는 domain으로 생각된다. 본 연구진은 eIF1A가 RNA annealing 활성을 가지고 있다는 것을 발견하고 이 활성의 생화학적 특성을 조사하여 보고한 바 있다(10). 또한 eIF1A가 double-stranded RNA에 안정적으로 결합한다는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 eIF1A가 RNA chaperone으로 기능하며 43S preinitiation complex 형성시 18S rRNA의 구조적 변화를 일으키도록 작용할 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 eIF1A의 RNA annealing 활성의 active site를 찾기 위하여 여러 가지 돌연변이 eIF1A 단백질을 제조하여 활성을 조사하였으며, RNA annealing 활성과 dsRNA에 결합하는 성질이 효모의 성장과 어떤 관계가 있는지를 돌연변이 효모를 이용하여 조사하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-32-860-7712, Fax: 82-32-874-6737
E-mail: sbac@inha.ac.kr

재료 및 방법

유전자 Cloning 및 돌연변이 제조

효모의 genomic DNA에서 PCR 방법으로 eIF1A를 암호화하는 유전자인 TIF11을 증폭하였다. 대장균에서 재조합 eIF1A를 발현시키기 위하여 증폭한 TIF11 유전자를 pET21α (Novagen, USA)의 *NdeI-XhoI* 자리에 cloning하였다. 이 때 사용한 PCR primer의 sequence는 다음과 같다. TIF11-1; 5'-CGC CAT ATG GGT AAG AAA AAC ACT AA-3', TIF11-13; 5'-CCG CTC GAG AAT GTC ATC AAT ATC AAG TT-3'. 밑줄 친 부분은 *NdeI*과 *XhoI* 인식 자리를 나타낸다. *XhoI* 인식 자리는 stop codon 앞에 도입되었기 때문에 이 plasmid로부터 발현되는 eIF1A의 C-말단에는 His tag이 융합된다. DNA sequencing으로 cloning한 유전자에 돌연변이가 없음을 확인하였다.

eIF1A의 Lys40을 Asp로 치환한 돌연변이 TIF11 유전자 K40D를 제조하기 위한 방법은 다음과 같다. Primer TIF11-1과 TIF11-18B (Table 1)를 사용하여 돌연변이를 기준으로 유전자의 앞부분을 증폭하였고, TIF11-18A와 TIF11-13을 사용하여 유전자의 뒷부분을 증폭하였다. 증폭한 두 개의 DNA 조각을 혼합하여 template로 사용하고 primer로 TIF11-1과 TIF11-13을 사용하여 완전한 ORF를 가지는 PCR 산물을 얻었다. 증폭한 DNA 조각을 pET21α의 *NdeI-XhoI* 자리에 cloning하고, DNA sequencing을 통하여 돌연변이를 확인하였다. 같은 방법으로 Table 1의 돌연변이들을 제조하였다.

효모에서 TIF11 유전자를 발현시킬 수 있는 plasmid를 만들기 위하여 promoter 부분을 포함하는 ORF의 5' 앞쪽 419 bp를 PCR로 증폭하여 pRS314의 *BamHI-EcoRI* 자리에 cloning하였다. 이 때 사용한 PCR primer는 다음과 같다. TIF11-6; 5'-CGC GGA TCC TAT CAA TGG TGT CAA TGA AC-3', TIF11-7;

5'-CAA GAA TTC CAT ATG TTT GA-3'. 밑줄 친 부분은 각각 *BamHI*, *EcoRI*, *NdeI* 인식 자리를 나타낸다. 이렇게 만들어진 plasmid의 *NdeI-XhoI* 자리에 stop codon을 포함하는 야생형 또는 돌연변이 TIF11 유전자를 cloning하였다.

균주 제조

염색체상의 TIF11 유전자는 knockout되고 plasmid에 TIF11 유전자를 가진 반수체(n) 효모 DTD101은 배수체(2n) 효모 YPH501 (MATa/MATα *ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101 trp1-Δ63/trp1-Δ63 his3-Δ200/his3-Δ200 leu2-Δ1/leu2-Δ1*)로부터 Baudin 등의 방법(3)에 따라 제조되었다. TIF11 유전자를 knockout하기 위하여 ORF의 5' 또는 3' 말단과 상동성을 갖는 primer (TIF11-8과 TIF11-9)를 사용하여 HIS3 marker를 증폭하였다. 이 때 사용한 PCR primer는 다음과 같다. TIF11-8; 5'-GGT GTA CTT GCA AAA GCA CTA GTG TAA TAT AGA GCA AAG TTC ATC GAT TGT ACT GAG AGT GAC CC-3', TIF11-9; 5'-TAG TTG ACG CAT TAG AAG ATA TTG AGG ACA CTT GTT CGG CCT AAA TGT GCG GTA TTT CAC ACC GC-3' 밑줄 친 부분은 각각 TIF11의 5' 또는 3' 말단과 상동성이 있는 sequence이다. 증폭한 DNA를 YPH501에 형질전환한 후, His⁺ colony를 선별하였다. 선별한 colony를 각각 배양하여 DNA를 추출하고 PCR을 통하여 TIF11 유전자가 HIS3 marker로 치환된 것을 확인하였다. 이렇게 만들어진 효모를 pRS316-TIF11(Ura⁺)으로 형질전환한 다음, 포자를 생성시켰다. 포자를 각각 분리하고 발아시켜 His⁺ Ura⁺인 colony를 선별하여 DTD101을 얻었다.

단백질 정제

야생형과 돌연변이 eIF1A 단백질들은 모두 대장균 BL21(DE3)

Table 1. Primers for site-directed mutagenesis

| Mutations | Primers | Sequences |
|-----------|-----------|---|
| K40D | TIF11-18A | 5'-TCA AAT CAC <u>CGA</u> CAT GTT GGG TAA TGG AAG AGT-3' |
| | TIF11-18B | 5'-TAC CCA ACA <u>TGT</u> CGG TGA TTT GAG CAT ATT CTT-3' |
| R46D | TIF11-19A | 5'-GGG TAA TGG <u>AGA</u> <u>CGT</u> CGA AGC CAG TTG CTT TGA-3' |
| | TIF11-19B | 5'-TGG CTT CGA <u>CGT</u> <u>CTC</u> CAT TAC CCA ACA TCT TGG-3' |
| R57D | TIF11-20A | 5'-TGG TAA TAA <u>GGA</u> <u>CAT</u> GGC CCA TAT TAG AGG TAA-3' |
| | TIF11-20B | 5'-TAT GGG CCA <u>TGT</u> <u>CCT</u> TAT TAC CAT CAA AGC AAC-3' |
| R62D | TIF11-14 | 5'-TGG CCC ATA TTG <u>ATG</u> GTA AGT TAA GAA AGA AAG-3' |
| | TIF11-15 | 5'-CTT AAC TTA <u>CCA</u> <u>TCA</u> ATA TGG GCC ATT CTC TTA-3' |
| R66D | TIF11-21A | 5'-AGG TAA GTT <u>AGA</u> <u>CAA</u> GAA AGT CTG GAT GGG ACA-3' |
| | TIF11-21B | 5'-AGA CTT TCT <u>TGT</u> <u>CTA</u> ACT TAC CTC TAA TAT GGG-3' |
| R82D | TIF11-15A | 5'-TGT TTC CTT <u>AGA</u> <u>CGA</u> TTT CCA AGA TCA CCA ATG-3' |
| | TIF11-15B | 5'-CTT GGA AAT <u>CGT</u> <u>CTA</u> AGG AAA CAA GAA TAA TAT-3' |
| K94D | TIF11-22A | 5'-TGT TGT CCA <u>CGA</u> <u>CTA</u> TAA TTT AGA TGA AGC CAG-3' |
| | TIF11-22B | 5'-CTA AAT TAT <u>AGT</u> <u>CGT</u> GGA CAA CAT CAC ATT GGT-3' |

* The underlined sequences are the mutation sites

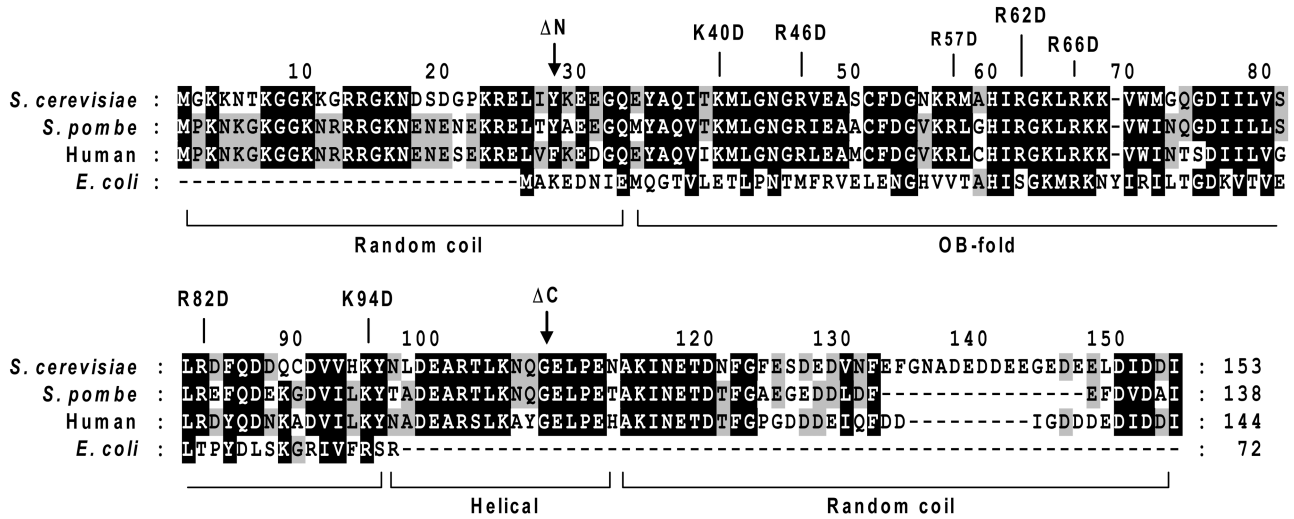


Fig. 1. Comparison of the eIF1A and IF1 amino acid sequences from different species. The alignment was created by the GeneDoc program. The positions of N- or C-terminal deletion made in eIF1A are indicated by the arrows. The point mutations are indicated by their positions of amino acid substitutions

에서 발현시켰으며, Ni^{2+} -NTA agarose column (Invitrogen)을 사용하여 (10)에 기술된 방법대로 정제하였다.

RNA annealing 활성과 dsRNA 결합 측정

[^{32}P]로 표지된 RNA 기질 제조와 RNA annealing 활성 측정 방법, 그리고 dsRNA 결합 측정을 위한 gel mobility shift assay는 Kwon 등(10)의 방법대로 수행하였다.

결과 및 고찰

RNA annealing 활성이 결여된 eIF1A 돌연변이 제조

진핵세포 eIF1A 단백질의 구조는 rRNA와 접촉하는 부위라고 생각되는 OB-fold domain과 짧은 α -helix 구조가 가운데 부분에 위치하고 있으며, N-말단과 C-말단 부분은 특별한 구조가 없는 random coil로 되어 있다(Fig. 1 and 2, 11). 본 연구진은 random coil 부분이 없고 OB-fold와 α -helix만으로 이루어진 eIF1A 단백질도 RNA annealing 활성을 갖는다는 것을 발견한 바 있다(10). 또한 eIF1A와 기능적/구조적 ortholog인 대장균의 IF1은 OB-fold domain으로만 이루어져 있지만(Fig. 1) RNA annealing 활성을 가지고 있다고 보고되었다(5, 10). 따라서 RNA annealing 활성은 OB-fold domain에 존재할 것으로 생각되며, 본 연구에서는 이를 증명하기 위하여 OB-fold 내의 잘 보존된 아미노산들을 치환하여 RNA annealing 활성이 없어진 돌연변이 eIF1A를 만들고자 하였다. 음전하를 띠는 RNA와 상호작용하기 위해서는 양전하를 띠는 아미노산이 중요할 것으로 예상되기 때문에 여러 종의 eIF1A 사이에 잘 보존된 Arg과 Lys을 선택하여 ‘재료 및 방법’에서 설명한 대로 Asp로 치환하였다(Fig. 1). 또한 N-말단 28 아미노산이 결여된 eIF1A(ΔN), C-말단 46 아미노산이 결여된 eIF1A(ΔC), 그리고 N-과 C-말단이 모두 결여된 eIF1A(ΔT)를 발현시키기 위한 plasmid도 제조하였다. 돌연변이 단백질들은 모두

대장균에서 야생형 eIF1A 단백질과 비슷한 수준으로 발현되었으며 Ni^{2+} column을 이용하여 순수분리하였다(Fig. 2). SDS-PAGE 상에서 eIF1A(ΔN)은 야생형 단백질과 비슷하게 이동하는 반면, eIF1A(ΔC)는 훨씬 빨리 이동하였다. 또한 각 점 돌연변이는 한 개의 아미노산만이 치환되었음에도 불구하고 돌연변이에 따라 band 위치에 차이가 있었다. SDS-PAGE에서 단백질의 이차구조가 완전히 파괴되지 않는 경우가 있어서, 아미노산 서열로 계산한 실제 분자량과 size marker와 비교한 전기영동 상의 겔보기 분자량이 다른 경우가 종종 있다. Histidine tag이 융합된 야생형 eIF1A의 분자량의 계산 값은 18.3 kDa이지만 전기영동에서는 약 23 kDa 정도로 보인다(Fig. 2). 또한 eIF1A는 특이하게도

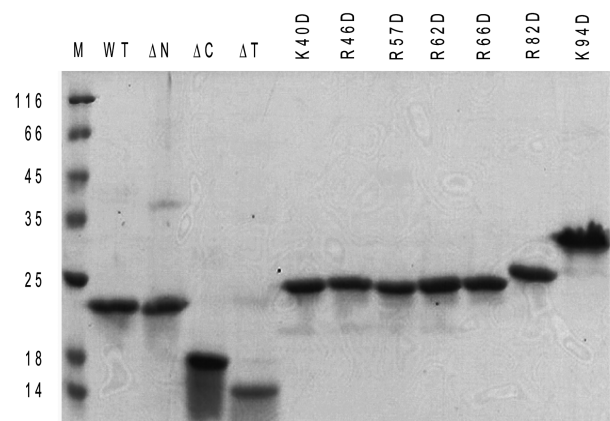


Fig. 2. Purification of eIF1As. The isolated eIF1As were analyzed by 16% SDS-PAGE. Each lane contained 1 μg of purified protein and the gel was subsequently stained with Coomassie brilliant blue. M denotes size markers. WT denotes wild-type eIF1A protein. ΔN and ΔC denote the truncated eIF1A devoid of the N- or C-terminal domain, respectively. ΔT lacks both domains. The eIF1As with point mutations are indicated by their positions of amino acid substitutions.

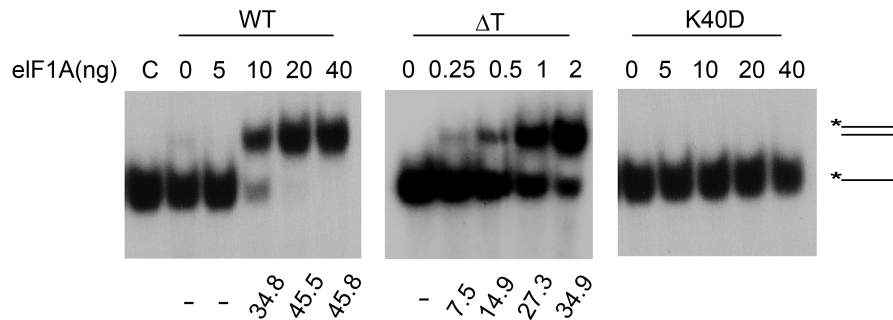


Fig. 3. Comparison of RNA annealing activities of wild-type and mutant eIF1A preparations. Reactions were performed with the indicated amounts of eIF1As. C denotes control reaction incubated without eIF1A. WT, ΔT , and K40D are as indicated in Fig. 2. The amounts of products are indicated at the bottom of the figure. The schematic structure of the substrate and product are shown at the right of the figure.

histidine tag이 N- 또는 C-말단 중 어디에 붙느냐에 따라 전기영동 양상에 큰 차이가 관찰되었다(10). 이러한 점을 고려하면, Fig. 2에서 관찰되는 돌연변이 eIF1A의 전기영동 상의 차이는 아마도 OB-fold의 이차구조가 SDS에 의해 변형되는 정도에 차이가 있기 때문으로 추측된다.

OB-fold domain만 가진 eIF1A(ΔT)는 야생형보다 더 강한 RNA annealing 활성을 보였다(Fig. 3). 이것은 이전의 결과(10)와 일치하는 것이며, RNA annealing 활성이 OB-fold에 존재한다는 것을 보여주는 결과이다. 점 돌연변이 eIF1A 단백질들의 RNA annealing 활성을 조사한 결과, 모두 활성이 없어진 것을 관찰하였다(Fig. 3). 야생형 eIF1A의 경우 10 ng을 반응물에 첨가했을 때 32 P로 표지한 거의 모든 RNA가 상보적인 RNA와 annealing되는 반면, eIF1A-K40D는 40 ng 이상을 첨가하여도 전혀 annealing을 촉매하지 못하였다. 다른 돌연변이 단백질들도 전혀 활성이 관찰되지 않았다(자료 미제시). 이러한 결과는 RNA annealing 활성을 나타내는 부위가 OB-fold에 위치할 것이라는 예상과 일치하는 결과이다. eIF1A의 OB-fold domain은 5개의 β -sheet가 turn이나 loop으로 연결되어 이루어진 원통형의 구조로서 원통의 표면이 RNA 결합 표면을 형성한다고 추측된다(2). 본 연구에서 도입한 돌연변이의 위치는 이러한 원통 표면에 고루 분포하고 있으므로 RNA annealing 활성에는 RNA 결합 표면 전체

가 관여한다고 예상된다.

야생형 eIF1A는 RNA annealing 활성뿐만 아니라 생성된 dsRNA에 결합하여 안정화된 복합체를 형성하는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 돌연변이 eIF1A의 경우, eIF1A(ΔC)는 야생형 단백질보다는 떨어지지만 dsRNA와 복합체를 형성하는 반면, eIF1A(ΔN)은 dsRNA에 전혀 결합하지 못하였다. 따라서 eIF1A가 RNA와 안정적인 복합체를 형성하기 위해서는 N-말단이 반드시 필요한 반면 C-말단은 필수적인 것은 아니라는 것을 알 수 있다. eIF1A(ΔC)-dsRNA 복합체가 야생형보다 훨씬 아래쪽에 위치하는 것은 eIF1A(ΔC) 단백질의 크기가 작기 때문으로 생각된다. 그리고 야생형과 eIF1A(ΔC)에서 복합체 band가 점점 위로 올라가는 것은 아마도 단백질 양이 증가함에 따라 하나의 dsRNA 기질에 두 개 이상의 단백질이 결합하기 때문으로 추측된다. OB-fold domain의 점 돌연변이 경우, R57D를 제외한 다른 돌연변이 eIF1A들은 모두 dsRNA에 결합하지 못하였다. R57D도 야생형에 비하면 매우 약한 결합력만을 보여주었다(Fig. 4). 따라서 eIF1A가 dsRNA에 결합하기 위해서는 N-말단과 함께 온전한 OB-fold domain이 필요하다고 생각된다.

돌연변이가 효모의 성장에 미치는 영향

eIF1A의 N-말단과 C-말단 부분은 다른 번역개시 인자들과 상

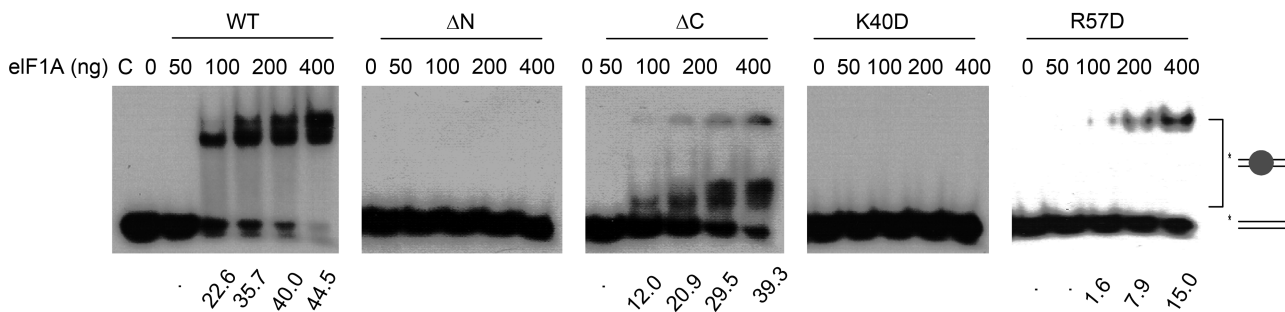


Fig. 4. Complex formation of eIF1A and dsRNA. Gel mobility shift assays were performed with the indicated amounts of eIF1As. C denotes control reaction incubated without eIF1A. WT, ΔN , ΔC , K40D, and R57D are as indicated in Fig. 2. The amounts of bound substrates are indicated at the bottom of the figure. The schematic structure of the substrate and the complex formed are shown at the right of the figure.

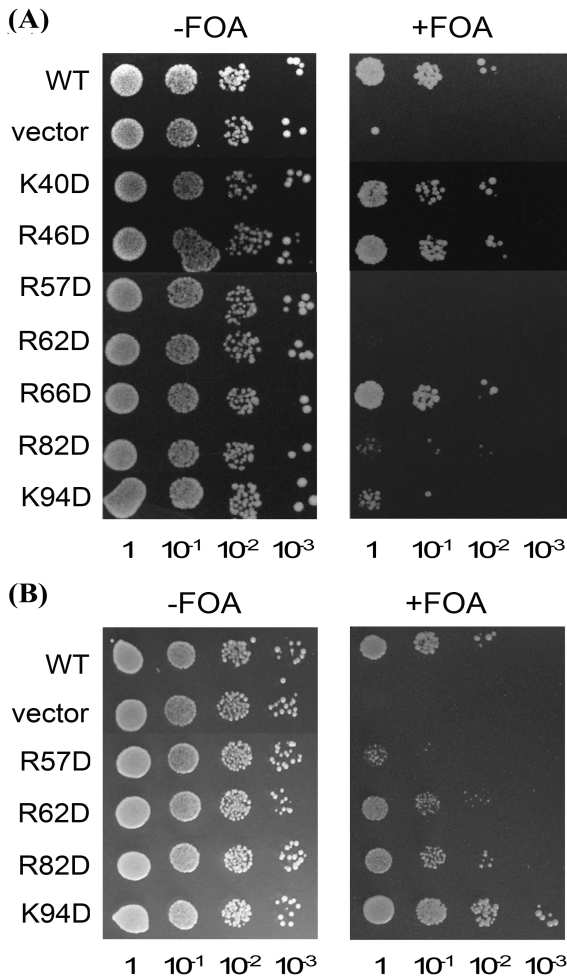


Fig. 5. Plasmid shuffling test of *tif11* mutants with its own promoter. (A) Strain DTD101 (YPH501 Δ *tif11*::HIS pRS316-TIF11) was transformed with pRS314-TIF11 (WT), pRS314 vector only (vector), and pRS314-*tif11*-X (X denotes the mutation). Transformants were grown to saturation and 10-fold serial dilutions were placed on synthetic medium lacking tryptophan in the absence (-FOA) or presence (+FOA) of 5-FOA. (B) Strain DTD101 was transformed with pRS424-TIF11 (WT), pRS424 vector only, and pRS424-*tif11*-X. Transformants were grown and placed on synthetic medium lacking tryptophan in the absence (-FOA) or presence (+FOA) of 5-FOA.

호작용하는 부위이다(6, 7, 13, 14). eIF1A의 유전자(TIF11)에서 C-말단 부분을 삭제하여도 효모가 생존하는 반면, N-말단 부분을

삭제하면 효모는 성장할 수 없다(8, 16). OB-fold domain에 돌연변이가 있는 경우에는 eIF1A 단백질이 40S subunit에 잘 결합하지 못하였으며, 돌연변이에 따라 효모의 성장에 치명적인 것도 있고 그렇지 않은 것도 있었다(6). 그러나 eIF1A의 RNA annealing과 dsRNA 결합 활성에 결함이 생긴 돌연변이가 효모의 생존에 미치는 영향은 조사된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 이를 조사하기 위하여 염색체 상의 TIF11 유전자가 knockout되고 야생형 TIF11 plasmid (pRS316-TIF11, Ura⁺)를 가진 효모 균주 DTD101을 제조하였다. 이 균주를 돌연변이 *tif11*이 cloning된 pRS314-*tif11*(Trp⁺)으로 형질전환한 다음, Ura가 들어 있는 액체 배지에서 배양한 후, 5-fluoroorotic acid (FOA)가 들어있는 배지에 도말하여 pRS316-TIF11를 잃어버린 효모(Ura⁻ Trp⁺)만 성장하도록 하였다(Fig. 5A). 야생형 TIF11이 pRS314에 cloning된 경우에는 효모가 잘 성장하였으며, pRS314 plasmid만으로 형질전환된 효모는 FOA 배지에서 전혀 성장하지 못하였다. 돌연변이 *tif11*의 경우, K40D, R46D, R66D에서는 야생형 유전자와 비슷한 수준으로 효모의 성장이 관찰되었으나, R82D와 K94D는 매우 약한 성장만 보였고, R57D와 R62D는 전혀 자라지 않았다(Fig. 5A). 이 실험에서 돌연변이 plasmid 종류에 따라 pRS316-TIF11 plasmid가 curing되는 정도가 달라질 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 R57D와 R62D는 많은 양을 오랫동안 배양하여도 Ura⁻ 효모를 얻을 수 없는 것으로 보아, 이 돌연변이들은 효모의 성장에 치명적이라고 생각된다. R82D와 K94D의 경우, FOA 배지에서 얻어진 colony를 FOA가 없는 배지에 배양하여 야생형 효모와 성장을 비교했을 때, 야생형보다 현저히 느리게 자라는 것을 관찰하였다(자료 미제시). 따라서 이 돌연변이들은 eIF1A의 기능에 중요한 결함이 생겼을 것으로 생각된다. 그러나 K40D, R46D, R66D가 정상적으로 잘 자라는 것을 고려하면 eIF1A의 RNA annealing과 dsRNA 결합 활성은 효모의 성장에 필수적이지 않다고 결론지을 수 있다.

R82D와 K94D 돌연변이에서 매우 느린 성장이 관찰되었으므로(Fig. 5A) 유전자의 copy 수를 늘려서 단백질의 양을 증가시키면 효모의 성장이 회복되는지 조사하였다. 이를 위하여 돌연변이 유전자가 cloning된 multi-copy plasmid (pRS424, Trp⁺)로 DTD101을 형질전환하였다. FOA 배지에서 효모의 성장을 관찰한 결과, plasmid만으로 형질전환한 경우는 효모가 전혀 성장하지 못하였으나 K94D 돌연변이가 multi-copy로 있는 경우에는 야생형보다 오히려 약간 더 빠른 성장을 보였으며, R82D도 상

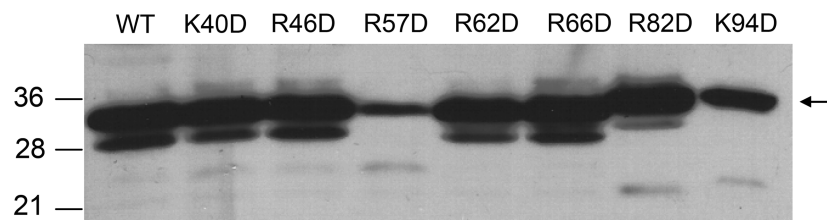


Fig. 6. Western blot analysis of eIF1As. Wild-type yeast cells (YPH499) were transformed with plasmid pRS314 containing wild-type (WT) or mutant *tif11* genes fused to HA tag. Cells were grown to mid-log phase, disrupted to prepare crude extract, and subjected to 16% SDS-PAGE. The levels of HA-eIF1As were compared by western blot analysis using anti-HA antibodies.

당한 성장의 회복을 보였다(Fig. 5B). R62D는 single-copy plasmid인 pRS314에 cloning 되었을 때는 전혀 효모의 성장을 뒷받침하지 못하였으나(Fig. 5A), multi-copy로 존재하는 경우 R82D와 비슷한 정도의 성장이 관찰되었다(Fig. 5B). 그러나 R57D의 경우에는 아주 미약한 정도의 성장 회복만이 관찰되었다. 이렇게 돌연변이 *tif1* 유전자의 copy 수를 늘림으로써 효모의 성장이 회복되는 이유로 세포 내에서 돌연변이 eIF1A 단백질의 안정성이 야생형보다 낮을 가능성을 생각할 수 있다. 즉, 돌연변이 eIF1A는 세포 내에서 쉽게 파괴되어 단백질의 양이 효모의 성장에 충분하지 않을 수 있다고 추측하였다. 이를 검증하기 위하여, HA tag이 융합된 야생형 또는 돌연변이 *tif1* 유전자를 pRS314에 cloning하고 야생형 효모에 형질전환한 후, anti-HA 항체로 세포내 HA-eIF1A의 상대적인 양을 비교하였다(Fig. 6). 야생형과 비교하여 R57D는 매우 낮은 단백질 양이 관찰되었으며 K94D도 약간 낮은 수준으로 존재하였다. 반면, 효모의 성장을 뒷받침하지 못했던 R62D와 R82D는 야생형과 비슷한 수준으로 존재하였다. 따라서 R57D와 K94D의 경우, 단백질의 안정성이 낮아서 효모의 번식 개시 과정에 충분한 정도의 단백질이 존재하지 않기 때문에 효모가 성장하지 못하는 것으로 추측된다. 그러나 다른 돌연변이의 경우에는 단백질의 안정성에 큰 문제가 없는 것으로 관찰되었기 때문에 eIF1A의 어떤 다른 기능이 약화되었거나 혹은 다른 번식 개시 인자들과의 상호작용에 문제가 생겨 효모가 성장하지 못하는 것으로 생각된다. 이에 대한 조사를 위해서는 43S preinitiation complex 형성과정에서 돌연변이 eIF1A와 다른 개시 인자들의 상호작용을 *in vitro*에서 연구할 필요가 있다.

감사의 말

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-041-C00240).

참고문헌

1. Acker, M.G., B.S. Shin, J.S. Nanda, A.K. Saini, T.E. Dever, and J.R. Lorsch. 2009. Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *J. Mol. Biol.* 385, 491-506.
2. Battiste, J.L., T.V. Pestova, C.U.T. Hellen, and G. Wagner. 2000. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Mol. Cell* 5, 109-119.
3. Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute, and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 14, 3329-3330.
4. Cristofari, G. and J.L. Darlix. 2002. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 72, 223-268.
5. Croitoru, V., K. Semrad, S. prenninger, L. Rajkowsch, M. Vejen, B.S. Laursen, H.U. Sperling-Petersen, and L.A. Isaksson. 2006. RNA chaperone activity of translation initiation factor IF1. *Biochimie* 88, 1875-1882.
6. Fekete, C.A., D.J. Applefield, S.A. Blakely, N. Shirokikh, T. Pestova, J.R. Lorsch, and A.G. Hinnebusch. 2005. The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection *in vivo*. *EMBO J.* 19, 3588-3601.
7. Fekete, C.A., S.F. Mitchell, V.A. Cherkasova, D. Applefield, M.A. Algire, D. Maag, A.K. Saini, J.R. Lorsch, and A.G. Hinnebusch. 2007. N- and C-terminal residues of eIF1A have opposing effects on the fidelity of start codon selection. *EMBO J.* 26, 1602-1614.
8. Kainuma, M. and J.W.B. Hershey. 2001. Depletion and deletion analyses of eukaryotic translation initiation factor 1A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 83, 505-514.
9. Kapp, L.D. and J.R. Lorsch. 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657-658.
10. Kwon, S.H., I.H. Lee, N.Y. Kim, D.H. Choi, Y.M. Oh, and S.H. Bae. 2007. Translation initiation factor eIF1A possesses an RNA annealing activity in its oligonucleotide-binding fold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 681-686.
11. Li, W. and D.W. Hoffman. 2001. Structure and dynamics of translation initiation factor aIF-1A from the archaeon *Methanococcus jannaschii* determined by NMR spectroscopy. *Protein Sci.* 10, 2426-2438.
12. Lorsch, J.R. 2002. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* 109, 797-800.
13. Maag, D., M.A. Algire, and J.R. Lorsch. 2006. Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J. Mol. Biol.* 356, 724-737.
14. Marintchev, A., V.G. Kolupaeva, T.V. Pestova, and G. Wagner. 2003. Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: A new interaction between old partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1535-1540.
15. Mayer, O., L. Rajkowsch, C. Lorenz, R. Konrat, and R. Schroeder. 2007. RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein SptA. *Nucleic Acids Res.* 35, 1257-1269.
16. Olsen, D.S., E.M. Savner, A. Mathew, F. Zhang, T. Krishnamoorthy, L. Phan, and A.G. Hinnebusch. 2003. Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment *in vivo*. *EMBO J.* 22, 193-204.
17. Sette, M.P. van Tilborg, R. Spurio, R. Kaptein, M. Pici, C.O. Gualerzi, and R. Boelens. 1997. The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* 16, 1436-1443.
18. Sittka, A., V. Pfeiffer, K. Tedin, and J. Vogel. 2007. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 63, 193-217.
19. Tompa, P. and P. Csermely. 2004. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* 18, 1169-1175.
20. Yu, Y., A. Marintchev, V.G. Kolupaeva, A. Unbehaun, T. Veryasova, S.C. Lai, P. Hong, G. Wagner, C.U.T. Hellen, and T.V. Pestova. 2009. Position of eukaryotic translation initiation factor eIF1A on the 40S ribosomal subunit mapped by directed hydroxyl radical probing. *Nucleic Acids Res.* advance access published on June 26, 2009.
21. Zuniga, S., I. Sola, J.L. Moreno, P. Sabella, J. Plana-Duran, and L. Enjuanes. 2007. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357, 215-227.

(Received August 26, 2009/Accepted September 21, 2009)

ABSTRACT : Mutational Analyses of Translation Initiation Factor eIF1A in *Saccharomyces cerevisiae*
Sung-Hun Kwon, Jun-Ho Kim, Bo-Kyung Choi, Na-Yeon Kim, Do-Hee Choi, Kyoung-Jun Park, Jung-Hyun Eoh, and Sung-Ho Bae* (Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea)

Translation initiation factor eIF1A performs essential functions in various initiation steps including 43S preinitiation complex formation in eukaryotes, and contains a highly conserved oligonucleotide-binding (OB) fold. In our previous study, we discovered that eIF1A possesses RNA annealing activity and forms a stable complex with double-stranded RNA. In this study, we initiated site-directed mutations in eIF1A to find the active sites for these biochemical activities and to investigate whether they are essential functions for yeast cell growth. A truncated protein, eIF1A(Δ T), devoid of both N- and C-terminal domains but containing an intact OB-fold exhibited RNA annealing activity. In contrast, all point mutations in OB-fold domain, except R57D, impaired both RNA annealing and dsRNA binding activities, indicating that the intact OB-fold domain is required for both activities. Viabilities of the mutant yeast cells were not correlated with RNA annealing activity but with the *in vivo* protein stabilities in the case of R57D and K94D.