

## (η<sup>6</sup>-Mesitylene)manganese-(I) Tricarbonyl Hexafluorophosphate를 사용한 *Pseudomonas Alcaligenes* 5S rRNA의 고차원 구조 분석

金尚範 · 朴仁源\*

서울대학교 자연과학대학 화학과  
(1997. 12. 12 접수)

## Analysis of Higher Order Structure of 5S rRNA from *Pseudomonas Alcaligenes* by Using (η<sup>6</sup>-Mesitylene)manganese-(I) Tricarbonyl Hexafluorophosphate

Sangbum Kim and Inwon Park\*

Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
(Received December 12, 1997)

**요약.** (η<sup>6</sup>-mesitylene)manganese-(I) tricarbonyl hexafluorophosphate [MTH-Mn(I)]과 황산 이메틸, 피로탄산 이에틸, 과망간산 칼륨 따위 화학탐침들을 사용하여 *Pseudomonas alcaligenes* 5S rRNA의 고차원 구조를 분석하였다. 5S rRNA의 삼차구조에서 MTH-Mn(I)이 강하게 절단하는 자리들은 a 고리의 G<sub>12</sub>AUGG<sub>16</sub>, b-C 구역의 3'쪽 가닥, 즉 G<sub>51</sub>AAGUGAAGC<sub>60</sub>, B-a 구역의 U<sub>65</sub>AGCG<sub>69</sub>, d 고리의 5'쪽 가닥의 G<sub>72</sub>AUGG<sub>76</sub> 연속부분들이다. MTH-Mn(I)과 그밖의 화학 탐침들을 사용하여 얻은 절단 양식들에서 우리는, MTH-Mn(I)으로 강하게 절단되는 연속부분들이 tRNA<sup>Pro</sup>의 L자 구조의 모서리 부분에서와 같은 주머니 구조를 이루고, 이러한 구조를 형성할 때 b-C 구역과 d 고리가 돌쩌귀 구실을 하는 것으로 추정한다.

**ABSTRACT.** The higher order structure of *Pseudomonas alcaligenes* 5S rRNA has been investigated by using (η<sup>6</sup>-mesitylene) manganese (I) tricarbonyl hexafluorophosphate[MTH-Mn (I)], dimethylpyrocarbonate, potassium permanganate as chemical probes. The sequences cleaved strongly by MTH-Mn (I) on the tertiary structure of the 5S rRNA are G<sub>12</sub>AUGG<sub>16</sub> of loop a, G<sub>51</sub>AAGUGAAGC<sub>60</sub> of the region b-C, U<sub>65</sub>AGCG<sub>69</sub> of the region B-a, and G<sub>72</sub>AUGG<sub>76</sub> of loop d. Based on such cleavage patterns of 5S rRNA by MTH-Mn(I) and other chemical probes, we presume that the sequences strongly cleaved form pocket-like structure as in the corner of L structure of tRNA<sup>Pro</sup>. We also presume that the region b-C and loop d together play a role of hinge in forming the pocket-like structure in the 5S rRNA.

### 서 론

RNA 분자의 생물학적 기능을 이해하는 데에는 RNA 분자의 접힘을 아는 것이 중요하다. 5S rRNA가 수용액에서 형성하는 삼차구조에 대해서는 지금 두 가지 모형들이 제안되어 있다. 즉, Ehresmann의 연구진은 Y 자형의 모형을 제안하였고<sup>1</sup> Nazar의 연구진은 롤리팝프형의 모형을 제안하였다.<sup>2</sup> 최근에, 우리는 합성한 정팔면체 배위화합물인(η<sup>6</sup>-mesitylene) manganese(I) tricarbonyl hexafluorophosphate [MTH-Mn(I)]<sup>3</sup>을 tRNA<sup>Pro</sup>에 구조-특이적으로 작

용하는 것을 관찰하였고, 이 화합물을 RNA의 삼차구조를 분석하는 chemical nuclease로 이용할 수 있으리라는 것을 보고한 바 있다.<sup>3</sup> 우리는 이 연구에서 MTH-Mn(I)이 tRNA<sup>Pro</sup>의 L자 구조의 모서리 부분에서 주머니 구조를 이루는 데 참여하는 단일가닥들과 염기-치쌓임(base-stacking)으로 안정화된 고리 구조들을 우선적으로 공격하는 것을 관찰하였다. 또한 우리는 이전의 연구에서 Fe(II)-EDTA, 몇 가지 화학 탐침들과 혼합하여 Pb(II)<sup>4,5</sup> Pb(II)<sup>6</sup> 이온, MPE-Fe(II)<sup>7</sup> 등을 사용하여 5S rRNA의 고차원 구조

를 분석한 결과들에 근거하여, b-C 구역과 d 고리가 삼차구조 형성에서 둘째귀 구실을 하면서 RNA 분자가 접힐 것이라고 제안하였다.<sup>8</sup> 우리는 용액에서 5S rRNA가 형성하는 삼차구조는 Nazar의 연구진이 제안한 룰리톱프형의 구조<sup>2</sup>와 유사한 것으로 생각한다.

본 연구에서는 MTH-Mn(I)과 몇 가지 화학 탐침들을 사용하여 *P. alcaligenes* 5S rRNA의 삼차원 구조 형성에서 b-C 구역과 d 고리가, 우리가 이미 보고한 것처럼, 둘째귀 구실을 하는지를 더 자세히 알아보고, tRNA<sup>Phe</sup>의 L자 구조의 모서리 부분에서 주머니 같은 구조를 만드는 연속부분들이 있는지를 조사해 보고자 하였다.

## 실험

### MTH-Mn(I)을 사용한 5S rRNA의 구조 분석.

Muragawa 등<sup>9</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. <sup>32</sup>P로 5'- 또는 3'-말단이 표지된 5S rRNA를 복원용 완충용액(25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl; pH 7.5) 70 μL에 녹인 다음, 65 °C에서 5분간 가열하고 서서히 상온까지 식혀서(1 °C/min) 5S rRNA를 자연상태의 구조로 복원시킨 후, 7 mM 과산화 수소와 7 mM 3-메르캅토프로피온산이 존재하는 조건에서 운반체 tRNA(5 μg/μL) 2 μL와 적당한 농도의 MTH-Mn(I)-용액 10 L를 가하고 25 °C에서 5분간 반응시켰다.

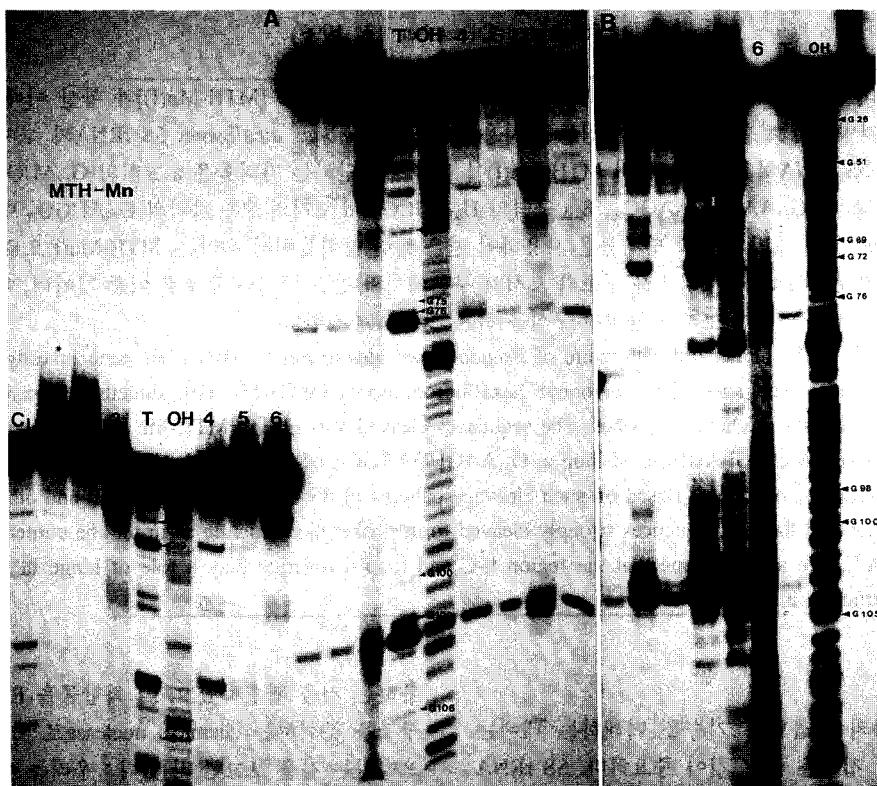


Fig. 1. 12% polyacrylamide gel electrophoresis fractionation of the 3'-end labeled *P. alcaligenes* 5S RNA after MTH-Mn(I)-induced cleavage. Prior to cleavage, 5S RNA was renatured in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>: (A) lane 1 through 3, 20 min at 25 °C; lane 4 through 6, 5 min at 25 °C. Reaction conditions are as follows: lane 1 and 4, MTH-Mn(I) only; lane 2 and lane 5, MTH-Mn(I) plus 3-mercaptopropionic acid; lane 3 and 6, MTH-Mn(I) plus 3-mercaptopropionic acid and hydrogen peroxide (complete reaction), respectively. T, RNase T<sub>1</sub>; OH, alkali ladders; C<sub>1</sub>, control. (B) Cleavage reaction was carried out in the presence of 7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 7 mM 3-mercaptopropionic acid at various temperatures and incubation times: lane 1 and 2, 5 min or 20 min at 5 °C; lane 3 and 4, 5 min or 20 min at 25 °C; lane 3 and 4, 5 min or 20 min at 55 °C, respectively. T, RNase T<sub>1</sub>; OH, alkali ladders; C<sub>1</sub>, control.

### 화학적 변형에 의한 5S rRNA의 구조 분석.

Peattie 등<sup>10</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 구아닌과 시토신의 메틸화 반응에 황산 이메틸(DMS)을, 아데닌의 카르베톡실화 반응에 피로탄산 이에틸(DEPC)을, 우라실의 산화반응에 과망간산 칼륨(KMnO<sub>4</sub>)들을 화학 탐침들로 사용하였다. 복원된 5S rRNA는 복원용 완충용액(50 mM 카코딜산 나트륨, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 270 mM KCl; pH 7.5)에서 MTH-Mn(I)을 사용한 방법과 같은 방법으로 처리하여 얻었고, 반복원된 상태의 5S rRNA는 반복원용 완충용액(50 mM 카코딜산 나트륨, 1 mM EDTA; pH 7.5)에서 위에서와 같이 처리하여 얻었다. 변성된 상태의 5S rRNA는 반복원용 완충용액에서 90°C에서 7분간 처리하여 얻었다.

### 결과 및 고찰

MTH-Mn(I)을 사용하여 5S rRNA를 절단하여 얻은 RNA 조각들과 화학 탐침으로 변형한 다음에 절단하여 얻은 RNA 조각들을 전기이동으로 분리한 결과를 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었고, MTH-Mn(I)과 화학 탐침으로 절단한 결과들을 종합해서 *P. alcaligenes* 5S rRNA의 이차구조 모형에 나타내었다(Fig. 3). MTH-Mn(I)을 사용한 경우에는 반응 혼합액에 3-메르캅토프로피온산과 과산화 수소 둘다를 함께 첨가한 조건에서 절단 반응을 일으켰으며(Fig. 1A), 또한 반응 시간과 반응 온도를 변화시키면서 그 영향을 관찰하였다(Fig. 1B).

5S rRNA의 삼차구조 상에서 MTH-Mn(I)은 a 고리의 G<sub>12</sub>AUGG<sub>16</sub>, b-C 구역의 3'쪽 가닥, 즉 G<sub>51</sub>AA-GUGAACG<sub>60</sub>, B-a 구역의 U<sub>65</sub>AGCG<sub>69</sub>, d 고리의 5'쪽 가닥의 G<sub>72</sub>AUGG<sub>76</sub> 연속부분들을 강하게 절단하였지만, b-C 구역의 5'쪽 가닥의 G<sub>26</sub>ACAC<sub>30</sub>, c 고리의 G<sub>44</sub>AA<sub>46</sub>, d 고리의 3'쪽 가닥의 G<sub>98</sub>AGAGUA<sub>104</sub> 연속부분들, e 고리의 A<sub>85</sub>C<sub>87</sub>G<sub>88</sub> 연속부분, E 줄기의 U<sub>80</sub>U<sub>81</sub> 들에서는 약하게 절단하였다(Fig. 3).

우리는 이전의 연구에서 d 고리가 비교적 안정한 고리 구조이며 b-C 구역과 함께 5S rRNA의 삼차구조에서 둘째귀 구실을 함으로써 a 고리와 c 고리 또는 a 고리와 e 고리 사이에 삼차상호작용을 할 것이라고 제안하였다.<sup>4,5,6</sup> 이때 b-C 구역의 3'쪽 가닥의 거의 모든 포스포디에스테르 결합들이 삼차구조 상

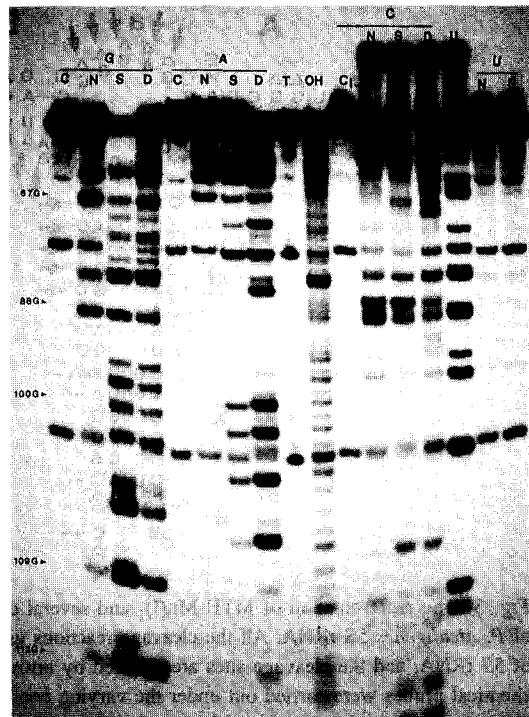


Fig. 2. 12% polyacrylamide gel electrophoresis fractionation of the 3'-end labeled 5S rRNA after DMS (guanine and cytosine-specific), DEPC (adenine-specific) and KMnO<sub>4</sub> (uracil-specific) modifications. G, guanine; A, adenine; C, cytosine; U, uracil; T, RNase T<sub>1</sub>; OH, alkali ladders; C<sub>1</sub>, control; N, S and D, native, semi-denaturing condition, respectively. The sequence is numbered by every G residue.

에서 수용액 환경 쪽으로 노출되어 있고, 5'쪽 가닥은 5S rRNA의 분자 안쪽으로 묻혀 있거나 이 가닥의 누클레오티드들이 다른 연속부분들과 삼차상호작용을 할 것이라고 제안한 바 있다.<sup>4,5,6</sup>

d 고리의 G<sub>72</sub>AUGG<sub>76</sub> 연속부분은 MTH-Mn(I)으로 강하게 절단되었으나 G<sub>98</sub>AGAGUA<sub>104</sub> 연속부분은 약하게 절단되었다. 반응 시간을 5분 또는 20분 그리고 반응 온도를 5°C, 25°C 또는 55°C로 점차적으로 증가시킴에 따라 약하게 절단되던 G<sub>98</sub>AGAGUA<sub>104</sub> 연속부분이 강하게 절단되었다(Fig. 1B). 이것은 반응 조건을 위와 같이 변화시킴에 따라 5S rRNA의 삼차구조가 변성하여 둘째귀 구실을 하는 d 고리의 입체 형태가 풀리면서 약하게 절단되던 G<sub>98</sub>AGAGUA<sub>104</sub> 연속부분에 대한 MTH-Mn(I)의 반응성이 증진하기 때문인 것으로 생각된다. 화학 변형에 의한 실험에서

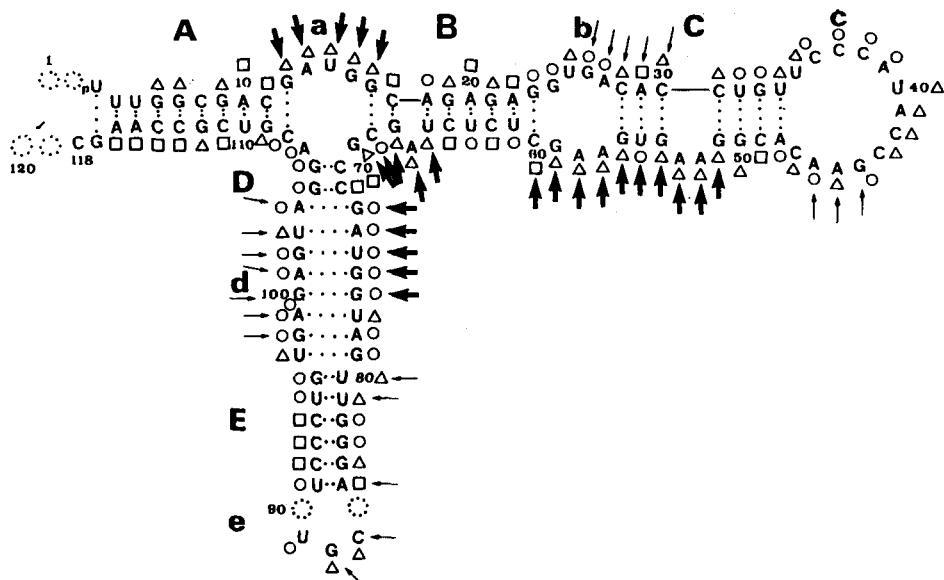


Fig. 3. The representation of MTH-Mn(I)- and several other chemical probes-induced cleavage pattern on the backbone of *P. alcaligenes* 5S rRNA. All the cleavage reactions using MTH-Mn(I) were carried out only with the native structure of 5S rRNA, and the cleavage sites are denoted by arrows: →, strong; ←, weak. The cleavage reactions using the other chemical probes were carried out under the varying conditions, native and semi-denatured. Varying reactivities of chemical probes: △, reactive under native condition; ○, reactive under semi-denaturing condition, but not under the native condition; □, reactive only under denaturing condition. ··· and ····· denote stable and unstable base pairs, respectively. Dotted circles at positions 1, 2, 86, 90, 119 and 120 denote the nucleotide deletions. They are added for the convenience of the numbering of the sequence.

는 d 고리 내의 모든 푸린 염기들이 복원 조건( $Mg^{2+}$ 이 있는 조건)에서는 화학 변형을 받지 않았지만  $Mg^{2+}$ 이 없는 반변성된 조건에서는 화학 변형을 받았다. 이러한 결과들로 미루어 d 고리는 분자 내에서 비교적 유연한 구조를 가지면서 돌쩌귀 구실을 하며, 분자 내의 다른 부분들과 삼차상호작용을 하는 데 관여하리라고 추측된다.

b-C 구역에서는 b 고리의 5'쪽의 푸린 염기들, 즉  $G_{23}G_{24}G_{26}A_{28}$  연속부분에 있는 염기들이 복원 조건에서 화학 변형을 받지 않았지만 b-C 구역의 3'쪽의  $G_{50}GAAGUGAAG_{59}$  연속부분은 복원 조건에서 화학 변형을 받았다. 또한 MTH-Mn(I)는  $A_{52}AGUGAACG_{60}$  연속부분을 강하게 절단하였으며, 반응 시간을 연장하거나 반응 온도를 올림에 따라 그러기 전에는 약하게 절단되던 5'쪽의  $G_{26}ACAC_{30}$  연속부분이 강하게 절단되었다. 이러한 사실들은 우리가 앞에서 추정한 b-C 구역의 입체 형태를 뒷받침한다. 즉, d 고리와 마찬가지로 돌쩌귀 구실을 하는 b-C 구역의 구조가 유연하다는 것을 암시한다.

a 고리의  $G_{12}AUGG_{16}$  연속부분의 누클레오티드들은 복원 조건에서 화학 변형을 받으며 MTH-Mn(I)에 의한 절단도 강하게 받았다. 따라서 5S rRNA의 삼차원구조에서 a 고리의  $G_{12}AUGG_{16}$  연속부분은 수용액 쪽으로 노출된 단일가닥을 이루고 있을 것으로 추측한다.

c 고리는 거의 모든 원핵생물의 5S rRNA들에서 잘 보존되어 있는  $U_{35}CCCAUN_{41}CCGAAC_{47}$  요소를 가지고 있다.<sup>8</sup> 우리는 다른 *Pseudomonas*와 *Xanthomonas* 종의 5S rRNA들에 대해 효소 탐침들이나 화학 탐침들을 사용한 실험에서 관찰한 결과에서 c 고리가 단순한 단일가닥의 상태로 있지 않을 것이라고 보고한 바 있다.<sup>8</sup> c 고리에서 MTH-Mn(I)에 의한 절단은  $G_{44}AA_{46}$ 에서 약하게 일어나 복원 조건에서  $C_{36}CCA_{39}$  연속부분이 화학 변형을 받지 않는다. 따라서  $C_{36}CCA_{39}$  연속부분은 5S rRNA의 다른 부분과 삼차상호작용을 하고  $G_{44}AA_{46}$  부분은 고리 내에서 염기들의 치쌓임으로 안정한 머리핀 구조 요소를 이를 것으로 추측된다. MTH-Mn(I)<sup>o</sup> RNA의 안정화

된 고리 구조에 약하게 작용할 수 있다는 것은 tRNA<sup>Phe</sup>에 대한 실험에서 관찰되었다.<sup>3</sup>

e 고리의 C<sub>87</sub>G<sub>88</sub> 연속부분은 복원 조건에서 MTH-Mn(I)로 약하게 절단될 뿐 아니라 같은 조건에서 다른 화학 탐침들으로도 화학 변형을 받았다. 이것은 e 고리가 수용액 쪽으로 노출되어 있으면서 안정한 형태의 고리 구조를 이루거나, 아니면 주머니 모양의 구조를 이루는 가닥들의 어느 하나와 삼차 상호작용을 할 수 있게끔 자리잡고 있다는 것을 암시한다.

한편, 이중나선 줄기에서는 MTH-Mn(I)에 의한 절단은 거의 일어나지 않았으며 E 줄기의 U<sub>80</sub>U<sub>81</sub>에서만 약하게 일어났는데, 반응 시간을 연장하거나 반응온도를 올림에 따라 이 자리가 점점 더 강하게 절단되었는데, 아마도 그 이유는 이 염기들이 각각 G<sub>96</sub>·U<sub>80</sub>과 U<sub>95</sub>·U<sub>81</sub>과 같은 비표준 염기쌍을 이루어서 U<sub>80</sub>·U<sub>81</sub>의 포스포디에스테르결합이 무리를 받고 있기 때문이라고 추측된다. B-a 구역의 U<sub>65</sub>AGCG<sub>69</sub> 연속부분은 MTH-Mn(I)로 강하게 절단되었으며 U<sub>65</sub>AG<sub>67</sub> 부분이 복원 조건에서 화학 변형을 받는 것으로 보아 A<sub>66</sub> 누클레오티드가 내밀린 구조를 형성하고 있어서 U<sub>65</sub>AG<sub>67</sub> 부분이 수용액 환경으로 두드러지게 노출되어 있음을 암시한다.

위의 결과들에서 우리는, MTH-Mn(I) o P. *alcaligenes* 5S rRNA의 삼차구조에서 강하게 절단하는 자리들인 a 고리의 G<sub>12</sub>AUGG<sub>16</sub>, b-C 구역의 3'쪽 가닥, 즉 G<sub>51</sub>AAGUGAAGC<sub>60</sub>, B-a 구역의 U<sub>65</sub>AGCG<sub>69</sub>, d 고리의 5'쪽 가닥의 G<sub>72</sub>AUGG<sub>76</sub> 연속부분 들이 tRNA의 구조에서 L자로 꺾기는 모서리 부분의 주머

니와 비슷한 구조를 이루는 구조 요소들이 되는 것으로 생각한다. 특히, 이러한 구조를 형성할 때 b-C 구역과 d 고리가 돌쩌귀 구실을 하는 비교적 유연한 구조를 이룰 것으로 생각한다.

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비(과제번호: BSRI 96-3418)의 지원으로 수행하였기에 이에 감사하는 바이다.

## 인 용 문 헌

- Brunel, C.; Romby, P.; Westhof, E.; Ehresmann, C. and Ehresmann, B., *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 293.
- Nazar, R. N. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4562.
- Kim, S.; Lee, Y.; Park, I. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1996**, 17, 951.
- 조봉래, 이영훈, 최명언, 박인원, 대한화학회지, **1992**, 37, 237.
- 조봉래, 김상범, 이영훈, 박인원, 대한화학회지, **1995**, 3, 9.
- 김상범, 이영훈, 박인원, 대한화학회지, **1995**, 39, 453.
- Kim, S.; Cho, B.; Lee, Y.; Park, I. *J. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 29, 133.
- 고문주, 조봉래, 김상범, 이영훈, 박인원, 대한화학회지, **1997**, 41, 371.
- Muragawa, G. J.; Chen, C. B.; Kuwabara, M. D.; Nierlich, D. P.; Sigman, D. S. *Nucleic Acid Res.* **1989**, 17, 5361.
- Peattie, D. A.; Gilbert, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, 77, 467.