Journal of the Korean Chemical Society
1999, *Vol. 43, No. 3*
Printed in the Republic of Korea

대장균에서 선구-M1 RNA의 3'-말단 가공에 관여하는 효소들의 부분 정제와 그 특성 조사

金河東 · 高在亨 · 趙峯來† · 李永勳†† · 朴仁源*
서울대학교 화학과
†청주대학교 화학과
††한국과학기술원 화학과
(1999. 3. 8 접수)

Partial Purification and Characterization of Enzymes Involved in the Processing of Pre-M1 RNA at the 3' End in *Escherichia coli*

Hadong Kim, Jaehyeong Ko, Bongrae Cho†, Younghoon Lee†† and Inwon Park*
Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
†Department of Chemistry, Chongju University, Chongju 360-764, Korea
††Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
(Received March 8, 1999)

요 약. 대장균의 RNase P의 RNA 성분인 M1 RNA는 대장균 *rnpB* 유전자의 주요한 일차전사물인 선구-M1 RNA로부터 3' 가공으로 생성된다. 이 가공 활성을 가지고 있는 효소 분획을 부분 정제하고 그 특성을 조사하였다. 이 활성 분획을 높은 염농도에 노출시키면 가공 활성이 불활성화하는 것으로 보아, 가공효소는 여러 효소로 이루어진 효소 복합체인 것으로 추정된다. 이 효소 분획은 화학적 핵산 가수분해효소인 납(II) 이온으로 처리하면 효소 활성을 잃지만, 효소 분획 자체에서 추출한 RNA를 가하면 효소 활성을 되찾는다. 이 결과는 효소 활성에는 RNA 분자가 필요하다는 것을 시사한다. 부분 정제한 효소로 형성되는 절단자리들의 분석 결과도, 3' 가공 과정이 여러 효소에 의하여 일어나고, 적어도 두 가지 다른 경로로 일어난다는 것을 암시한다.

ABSTRACT. M1 RNA, the RNA component of RNase P from *Escherichia coli*, is produced by 3' processing of pre-M1 RNA, a major primary transcript of the *rnpB* gene. The enzyme fraction containing the processing activity was partially purified and characterized. Since exposure of the active fraction to the high salt condition results in the inactivation of the processing activity, the processing enzyme seems to be an enzyme complex composed of multiple enzymes. The enzyme fraction loses the processing activity when treated with the chemical nuclease lead(II) ion, but regains its activity by the addition of RNA isolated from the enzyme fraction itself, suggesting that an RNA molecule(s) may be essential for the processing activity. Analysis of cleavage sites produced by the partially purified enzyme fraction also implies that the 3' processing occurs by multiple enzymes and at least in two distinct pathways.

서 론

RNA 가공(RNA processing)은, 세포에서 기능을 가진 RNA 분자들의 성질을 결정하는, RNA 대사의 중요한 형태이며, 전사로 생성된 RNA 분자들을 기능을 가진 RNA 분자들로 만드는 일이다.[1,2] 대장균에서 선구-tRNA의 5' 말단 부분을 가공하여 성숙한 tRNA로 만드는 효소인 RNase P는 단백질 소단위체(C5 단백질)와 촉매성 RNA 소단위체(M1 RNA)의 두 성분으로 구성되어 있다.[3] 이들 중 M1 RNA는, *rnpB* 유전자의 일차전사물인 선구-M1 RNA의 3' 말

단에서 여분의 누클레오티드들이 절제됨으로써 형성된다.[4-8] 선구-M1 RNA의 가공자리 근처에 RNase E가 인식하는 염기 결합순서와 똑같은 연속부분이 있는 것으로 보아, 선구-M1 RNA 가공효소는 RNase E 일 것으로 추측되기도 하였다. 실제로, 이 RNase E 인식자리를 돌연변이시켜서 실험한 결과들에서 RNase E 인식자리의 염기 결합순서가 M1 RNA 가공에서 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다.[9] 이러한 연구결과는, RNase E⁻ 돌연변이 균주에서 선구-M1 RNA가 축적된다는 사실과도 일치한다.[4] 그러나, 선구-M1 RNA는 정제된 RNase E의 기질이 아니라는 것이 밝혀져 있다.[4] 이러한 사실들을 종합해 보면, 선구-M1 RNA는 RNase E만으로 직접 가공되는 것이 아니라, RNase E 인식자리를 통하여 RNase E로 인식되어서, RNase E와 관련된 효소들의 협조적 활성으로 가공될 가능성이 있다. 이러한 사실과 관련하여, Lundberg와 Altman[7]은 M1 RNA의 3' 가공과정이 RNase E에 의존한다고 제안하였다. 이러한 사실들을 고려하면, M1 RNA의 가공에 관여하는 효소는 RNase E를 포함한 몇 가지 가공효소들의 복합체일 것으로 생각할 수 있다. Apirion의 연구진은, 대장균에서 RNA 가공이 따로따로 떨어진 별개의 RNase들로 일어나는 것이 아니라, 여러 효소들로 구성된 프로세서좀(processeosome)이라는 복합체로 일어나며, 이 복합체에서 RNase E가 핵심 성분일 것이라는 가설을 내놓았다.[10] 그뿐 아니라, RNase E는 대장균의 일반적 RNA 가공과정에서 중추적인 역할을 한다는 것이 알려져 있다.[11,12] 최근에, 이영훈 연구진은 선구-M1 RNA의 3' 말단은 간단한 가공반응으로 일어나는 것이 아니라, 몇 가지 가공경로와 단계들을 거쳐 일어난다는 것을 밝혔다.[13] 이 결과도 선구-M1 RNA의 3' 말단 가공에는 여러 효소들이 관여하고 있다는 증거가 된다. 그러나, 현재까지 이러한 효소들의 특성에 관해서는 알려진 것이 거의 없다. 본 연구에서는, 선구-M1 RNA의 가공과정을 이해하기 위해서 선구-M1 RNA의 3'-말단의 가공에 관여하는 효소들을 부분 정제하여 이들의 특성을 조사하였다.

실 험

선구-M1 RNA의 제조. 선구-M1 RNA를 시험관내에서 전사반응으로 합성할 수 있는 플라스미드를 제조하기 위하여, 먼저 M1 RNA를 지정하는 *rnpB* 유전자가 들어있는 플라스미드 pLM1[14]의 1152 bp *Alu*I DNA 조각을 얻었다. 이 DNA 조각을 pSELECT-1의 *Sma*I 자리에 삽입하여 재조합 플라스미드 pSLM1을 얻었다. Promega의 Altered Sites System을 이용하여, T7 RNA 중합효소로 전사가 M1 RNA의 +1에서 시작하고, 선구-M1 RNA의 3' 말단에 *Dra*I 자리(+415)가 생기도록 pSLM1을 돌연변이시켰다. 이 때 사용한 올리고누클레오티드는 전사 시작점 부근에 결합하는 올리고누클레오티드 1(29개 누클레오티드: 5' GACTCACTATAGAAGCTGACCAGACAGTC 3')과 전사 종결점 부근에 결합하는 올리고누클레오티드 2(29개 누클레오티드: 5' GGTTTTTGCTTTAAAA GGGGCAGAAAGAT 3')이었다. 돌연변이로 얻은 플라스미드는 pSEPM1이라고 명명하였다. DNA 염기 결합순서를 분석하여,[15] 플라스미드 pSEPM1의 전사 시작점의 염기 결합순서가 정상 M1 RNA의 5' 말단 염기 결합순서와 동일한지, 그리고 전사 종결점에 제한효소 *Dra* I의 절단자리가 생겼는지를 확인하였다. 선구-M1 RNA를 제조하기 위해서, 플라스미드 pSEPM1 DNA를 *Dra*I으로 절단해서 얻는 생성물을 T7 RNA 중합효소로 시험관내에서 전사하였다.[16] 내부가 결실된 선구-M1 RNA는 플라스미드 pSPd23 DNA8를 *Dra*I으로 절단해서 얻는 생성물을 SP6 RNA 중합효소로 시험관내에서 전사하여 제조하였다.[16]

선구-M1 RNA의 ^{32}P 표지. 선구-M1 RNA(자연의 것과 내부가 결실된 것)의 표지는 ^{32}P로 내부 표지하거나, 3' 말단을 [5'-^{32}P] pCp와 RNA 연결효소로 표지하였다.[16]

가공 활성의 분석. 완충용액 1(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 60 mM NH_4Cl, 1 mM $MgCl_2$) 20 μL, ^{32}P로 표지한 선구-M1 RNA 용액 2 μL(약 3000 cpm), 가공 효소 용액 5 μL (단백질 양으로 1-50 μg/mL)를 섞고 반응시켰다. 반응은 페놀을 가하여 정지시키고, 가공 반응의 생성물들을 페놀 추출법으로 정제한 후, 폴리아크릴아미드 겔에서 전기이동법으로 분석하였다.

S30 분획과 황산 암모늄 침전 분획의 제조. 가공효소들의 추출에는 RNase I에 결함이 있는 대장균 1500 균주를 사용하였다. 대장균 세포 15 g을 4 °C로 식힌 막자사발에서 알루미나를 넣고 골고루 간 후,

파쇄액에 완충용액 2(50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 60 mM NH_4Cl, 1 mM $MgCl_2$) 50 mL를 가하고 30,000×g에서 원심분리하여 S30 분획을 얻었다. 이 S30 분획에 80%$(NH_4)_2SO_4$ 용액을 적절히 첨가하여 단백질 침전물을 얻고, 그것을 완충용액 1에 용해하여 여러 농도별 황산 암모늄 침전(ammonium sulfate precipitate: ASP) 분획들을 얻었다.

Sephadex G100을 사용한 겔 거르기 관 크로마토그래피. S30 분획을 Sephadex G100 관 크로마토그래피를 이용하여 더 세분하고, 각 분획의 가공활성을 분석하였다.

DEAE-Sepharose관 크로마토그래피. Sephadex G100 관 크로마토그래피로 얻은 가공 활성 분획을 DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피로 다시 세분하였다. KCl 농도를 선형 기울기로(0 M에서 0.35 M까지) 올려가면서 단백질을 용리하였고, 각 분획의 가공 활성을 분석하였다. 이 때 용리액은 40 mM Tris-Cl, pH 7.7, 60 mM NH_4Cl이었다. 각 분획의 가공 활성을 분석해서 가공 활성이 있는 분획에 농도가 20%가 되도록 폴리에틸렌글리콜을 넣어서 단백질을 침전시키고 원심 분리하여 단백질을 회수하였다.

여러 가지 화학물질이 가공 활성에 미치는 영향. 20-40% 황산 암모늄 분별 분획을 가공 활성 분석의 시료로 사용하였다. 활성 분획 10 μL에 각각 10 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol: DTT) 10 μL , 50 mM EDTA 10 μL, 0.1 M 2-머캅토에탄올 10 μL, 또는 83 mM 플루오르화 페닐메틸술포닐(phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF) 10 μL를 섞은 후 4°C에서 4시간 반응시켰다. 이 반응물에 30 μL의 완충용액 1과 ^{32}P로 내부표지한 결실 선구-M1 RNA를 넣고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응생성물을 페놀 추출하고, 에탄올 침전을 한 후 5% 폴리아크릴아미드, 8 M 우레아 겔에서 전기이동하여 분리하였다.

선구-M1 RNA가 절단되는 자리의 결정. 5' 말단의 염기 결합순서를 결정하기 위해서, 선구-M1 RNA의 3' 말단을 ^{32}P로 표지한 것을 활성 분획으로 절단해서 형성된 생성물과 화학적 방법을 이용한 부분가수분해물을 10% 폴리아크릴아미드, 8 M 우레아 겔 상에서 함께 전기이동하여 분리하였다. 부분가수분해물은 3' 말단을 ^{32}P로 표지한 선구-M1 RNA를 특이한 화학시약들을 사용하여[17-19] 구아노신, 아데노신, 시티딘, 우리딘 들을 변형한 다음에 아닐린에 의한 절단반응과, 알카리 가수분해 반응으로 제조하였다.

Pb^{2+} 이온을 이용한 가공효소의 불활성화. DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피에서 얻은 분획번호 41번에서 50번까지를 활성 분획으로 사용하였다. 활성 분획 50 μL에 존재하는 RNA를 절단하기 위하여 9.3 mM $Pb(OAc)_2$ 용액 6 μL를 섞고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 그 다음에 Pb^{2+} 이온의 RNA 절단 활성을 불활성화하기 위하여, 50 mM EDTA 1.2 μCL를 넣고 4°C에서 60분간 더 반응시켰다. 이 반응물에 1 M $MgCl_2$ 5 μL와 ^{32}P로 내부표지한 결실 선구-M1 RNA 2 μL, 50% 폴리에틸렌글리콜 2.5 μL를 섞고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 최종 반응생성물을 페놀 추출하고, 에탄올 침전시킨 후, 5.5% 폴리아크릴아미드, 8 M 우레아 겔에서 전기이동하여 반응 정도를 분석하였다.

불활성화한 효소 분획의 RNA에 의한 재활성화. DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피로 얻은 활성 분획 약 30 mL에 에탄올을 첨가하여 단백질과 RNA를 침전시키고, 침전물을 물에 녹여 페놀 추출하고, 같은 부피의 이소프로필 알코올로 RNA를 침전시켰다. 이 RNA를 30 μL의 증류수에 녹이고, Pb^{2+} 이온으로 불활성화한 활성 분획에 첨가하여 가공 활성이 다시 살아나는지를 조사하였다. 추출한 RNA를 불활성화한 효소 분획에 여러 농도로 섞고 37°C에서 15분간 반응시켜 활성 분획을 재구성하였다. 추출한 RNA 100 ng과 400 ng을 각각 불활성화한 효소 분획에 섞어서 활성 분획을 재구성하였고, 대조실험으로 tRNA를 불활성화한 효소 분획에 각각 100 ng, 400 ng, 800 ng을 섞어서 활성 분획을 재구성하였다. 이렇게 재구성한 분획에 ^{32}P로 내부표지된 결실 선구-M1 RNA와 50% 폴리에틸렌 글리콜 2.5 μL, 1 M $MgCl_2$ 0.5 μL를 섞고 33°C에서 30분간 반응시켰다. 반응생성물을 페놀 추출하고, 에탄올 침전시킨 후 반응 정도를 5.5% 폴리아크릴아미드, 8 M 우레아 겔에서 전기이동하여 분석하였다.

결 과

기질로 사용할 선구-M1 RNA의 합성. 시험관내 전사 반응으로 선구-M1 RNA를 제조하였다. 이 목적으로, T7 RNA 중합효소로 M1 RNA의 5' 말단에 상응하는 자리에서 전사가 시작되고, +415에 *Dra*I

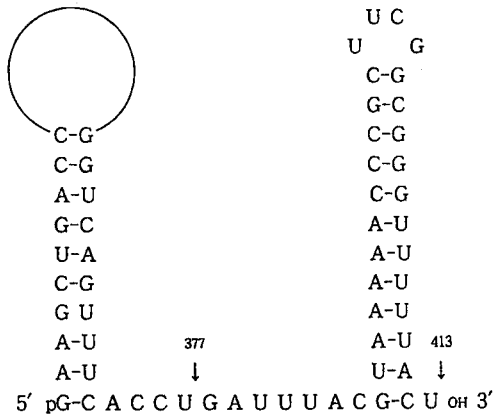

Fig. 1. Structure of pre-M1 RNA. Only sequence and secondary structure surrounding the processing site are shown. The mature M1 RNA of 377 nucleotides is produced by 3' processing from pre-M1 RNA of 413 nucleotides.

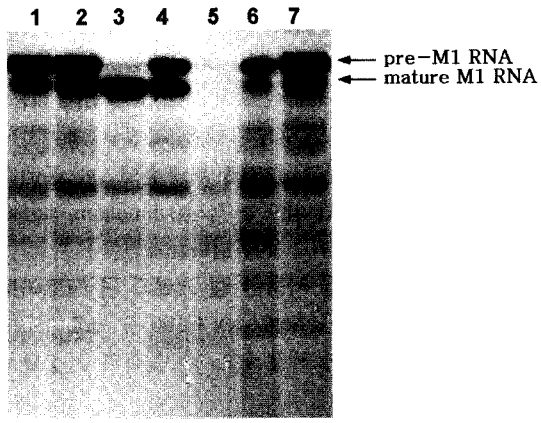

Fig. 2. Differential precipitation of the S30 fraction by ammonium sulfate. The S30 fraction was subfractionated by adding varying amounts of ammonium sulfate. Each ammonium sulfate precipitate was assayed with ^{32}P-labeled pre-M1 RNA. The reaction products were analyzed on a 10% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Lane 1, pre-M1 RNA alone; lane 2, 0-20% ammonium sulfate precipitate; lane 3, 25-35% ammonium sulfate precipitate; lane 4, 35-45% ammonium sulfate precipitate; lane 5, 45-55% ammonium sulfate precipitate; lane 6, 55-85% ammonium sulfate precipitate; lane 7, supernatant of 85% ammonium sulfate precipitation.

절단자리를 가진 플라스미드 pSEPM1을 제조하였다. 플라스미드 pSEPM1 DNA를 *Dra*I으로 절단하여 얻는 생성물을 T7 RNA 중합효소로 시험관내에서 전사하여 선구-M1 RNA를 합성하였다(*Fig.* 1). 이렇게 제조한 선구-M1 RNA는 3'-말단에 생체내에 존재하는 선구-M1 RNA(413개 누클레오티드)보다 2개의 누클레오티드를 더 가지고 있다.[4] 우리는 선구-M1 RNA가 3'-말단에 2개의 누클레오티드를 더 가지고 있어도 3' 가공의 기질이 된다는 것을 보고한 바 있다.[8] 선구-M1 RNA의 길이가 비교적 길어서 분석이 어려울 경우에는 M1 RNA의 내부 연속부분이(+56에서 +330까지) 결실된 결실 선구-M1 RNA를 사용하였다. 이 결실 선구-M1 RNA를 시험관내 전사반응으로 얻기 위하여 플라스미드 pSPd23 DNA[8]를 기질로 사용하고, 효소로는 SP6 RNA 중합효소를 사용하였다. 결실 선구-M1 RNA도 3' 가공의 기질이 될 수 있다.[8]

가공효소의 부분 정제. 대장균 1500 세포에서 S30 분획을 얻었다. S30 분획을 황산 암모늄으로 분별 침전시켜 세분한 분획들을 얻어 가공 활성을 분석하는 데 사용하였다(*Fig.* 2). 25-35% 분획에서 활성이 가장 높았고, 25% 이하의 분획과 35-45% 분획에서는 활성이 약하였다. 그러므로, 황산 암모늄으로 분별 침전시킬 때는 20-40% 분획에서 대부분의 선구-M1 RNA 가공 활성을 회수할 수 있었다. 그러나, 20-40% 분획의 가공효소를 더 세분하기 위하여 DEAE-Sepharose관 크로마토그래피를 하면, 대부분의 가공 활성이 두드러지게 떨어졌다. 그 이유는 아직 알 수 없으나, 황산 암모늄으로 침전될 때 원래 복합체 상태로 있던 가공효소의 성분들이 해리해서, 관 크로마토그래피 단계에서 복합체의 일부 성분이 회수되지 않았기 때문으로 설명할 수 있다. 이러한 이유 때문에, 황산 암모늄 분별 침전으로부터 가공효소를 정제하는 방법을 그만두고, S30 분획으로부터 정제를 다시 시작하였다. S30 분획을 Sephadex G100 겔 거르기로 분리한 후, 분획들의 가공 활성을 분석하면, 분획번호 46번에서 115번까지를 모은 부분에서 활성이 가장 강하게 존재하였다(*Fig.* 3). Sephadex G100을 사용한 겔 거르기에서 얻은 가공 활성 분획(46번에서 115번까지)을 염 조성이나 pH 변화 없이 그대로 DEAE-Sepharose 관에 싣고 염화칼륨 농도를 0 M에서 0.35 M의 선형 기울기로 증가시키면서 단백질을 용리해서, 각 분획의 가공 활성을 분석하였다(*Fig.* 4). 가공 활성이 있는 41번에서 50번까지의 분획들을 모아서 20% 폴리에틸렌글리

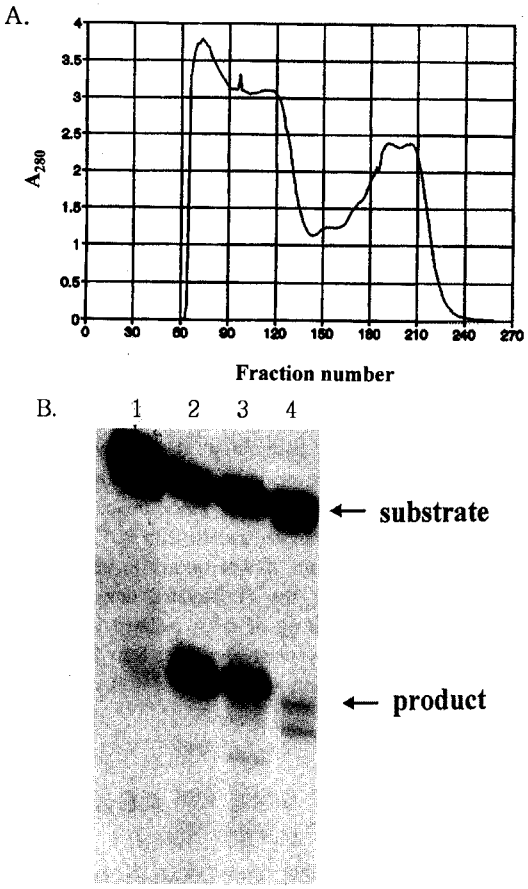

Fig. 3. Separation of processing activities through Sephadex G100 gel filtration. (A) Chromatogram of protein. Amounts of protein were determined by observing absorbance at 280 nm. (B) Analysis of processing activity of eluted subfractions. The truncated pre-M1 RNA was incubated with eluted subfractions and the reaction products were analyzed on a 5% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Lane 1, truncated pre-M1 RNA alone; lane 2, S30 fraction; lane 3, subfractions 46 through 115; lane 4, subfractions 116 through 258.

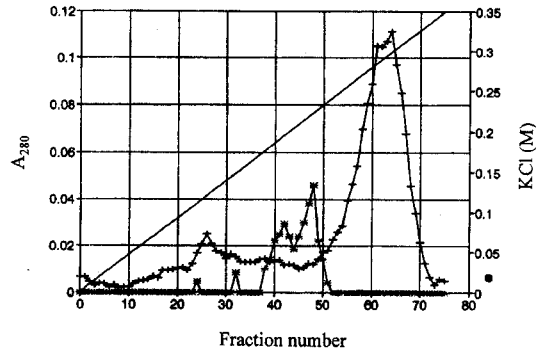

Fig. 4. Separation of processing activity through DEAE-Sepharose column chromatography. Amounts of protein (shown by +) was determined by observing absorbance at 280 nm. Relative processing activities were shown by asterisks (*).

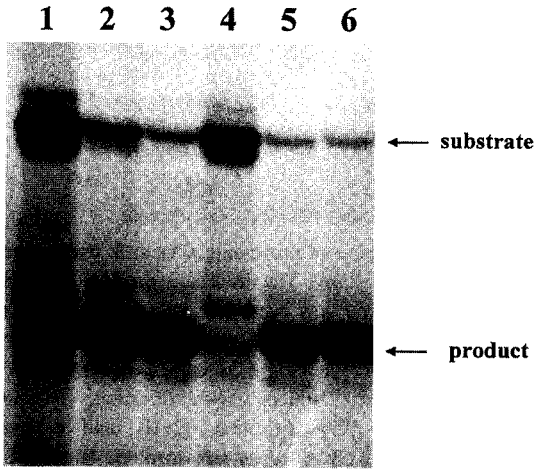

Fig. 5. Effects of various chemicals on processing activity of 20-40% ammonium sulfate precipitation (ASP). The processing activity of 20-40% ASP was analyzed in the presence of various chemicals. The reaction products were analyzed on a 5% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Lane 1, truncated pre-M1 RNA; lane 2, truncated pre-M1 RNA with 20-40% ASP; lane 3, as in lane 2 in the presence of DTT; lane 4, as in lane 2 in the presence of EDTA; lane 5, as in lane 2 in the presence of 2-mercaptoethanol; lane 6, as in lane 2 in the presence of PMSF.

콜로 침전시켜 단백질을 회수하였다.

여러 가지 화학물질이 가공 활성에 미치는 영향. 황산 암모늄 20-40% 분별 침전 분획에 DTT, EDTA, 2-머캅토에탄올, PMSF를 섞고 항온 처리한 다음, ^{32}P로 내부표지한 결실 선구-M1 RNA를 기질로 사용하여 가공 활성을 분석한 결과를 보면, EDTA만 두드러지게 가공 활성을 감소시켰으며, 다른 것들은 가공 활성에 영향을 주지 않았다(*Fig.* 5). EDTA의 첨가로 가공 활성이 없어지는 것으로 보아, 2가 양이온이 가공 활성의 보조인자로 필요하다는 것을 알 수 있었다.

선구-M1 RNA가 절단되는 자리. 3' 말단에 ^{32}P로 표지한 결실 선구-M1 RNA를 기질로 하여 S30 분획 또는 DEAE-Sepharose관 크로마토그래피로 얻는 41

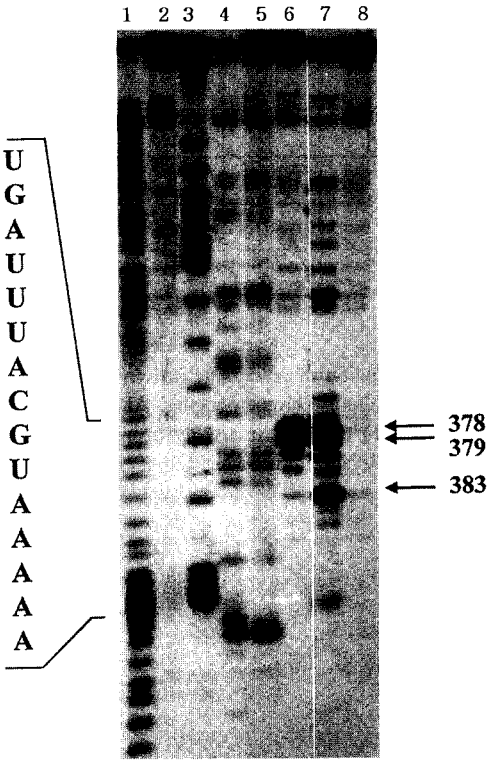

Fig. 6. Identification of processing sites at 3' terminal region of pre-M1 RNA. The truncated pre-M1 RNA labeled at the 3' end was incubated with the partially purified enzyme fractions and analyzed on a 10% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Lanes 1 to 5, alkaline hydrolysis ladders, G-modification, A-modification (A>G), C-modification (C>U), and U-modification, respectively, used as size markers; lane 6, the S30 fraction; lane 7, the partially purified enzyme fraction through DEAE-Sepharose column chromatography; lane 8, the truncated pre-M1 RNA alone. The cleavage sites were indicated on the right of the figure.

번에서 50번까지의 분획들을 모은 분획과 반응시켜 얻는 생성물의 5' 말단의 염기를 분석하여 절단자리를 정하였다(*Fig.* 6). S30 분획은 +378번의 G 자리와 +379번의 A 자리를 절단하였으며, DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피의 활성 분획은 +378번의 G 자리와 +379번의 A 자리뿐 아니라, +383번의 A 자리도 절단하였다. 이 결과는 선구-M1 RNA의 가공에는 몇 가지 다른 효소들이 관여하고 있으며, 절단반응은 적어도 두 가지의 서로 다른 경로로 일어난다는 것을 암시한다.

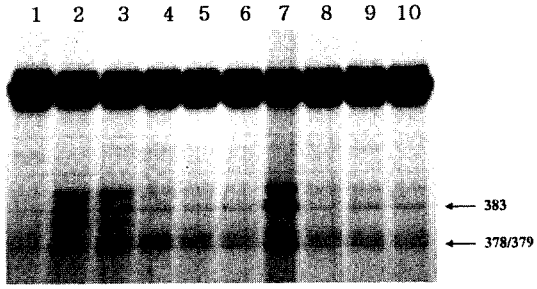

Fig. 7. Reactivation of Pb^{2+}-inactivated enzyme fraction by RNA molecules. The pre-M1 RNA internally labeled with ^{32}P was incubated with the following enzyme preparations. The reaction products were analyzed on a 5.5% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Lane 1, no enzyme; lane 2, the partially purified enzyme fraction through DEAE-Sepharose column chromatography; lane 3, the enzyme fraction with the mock treatment of Pb^{2+}; lane 4, the enzyme fraction treated with Pb^{2+}; lane 5, the enzyme fraction of lane 4 was further incubated for 15 min; lanes 6 and 7, the Pb^{2+}-treated enzyme fraction with 100 ng and 400 ng of RNA isolated from the enzyme fraction itself, respectively; lanes 8 to 10, the Pb^{2+}-treated enzyme fraction with 100 ng, 400 ng, and 800 ng of tRNA, respectively.

가공 효소의 Pb^{2+} 이온에 의한 불활성화와 RNA에 의한 재활성화. Pb^{2+}으로 처리하여 불활성화한 가공 활성 분획(앞에서 말한 DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피로 얻은 분획)에다 같은 가공 활성 분획에서 추출한 RNA를 첨가하면 가공 활성이 재활성화한다. 그 결과를 *Fig.* 7에 나타내었다. 첨가한 RNA가 100 ng일 때는 재활성화하지 않지만, 첨가량을 400 ng으로 늘리면 재활성화하였다. 다른 한편, tRNA를 800 ng까지 첨가하여도 활성은 되살아나지 않았다. 이 결과로 가공 활성에는 어떤 특별한 RNA 성분이 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다. 특히, +383의 A 자리에서 절단 활성의 재활성화가 두드러지게 일어났다.

고 찰

일반적으로 효소 정제 과정은 세포 파쇄액에서 S30 분획을 얻은 다음 황산 암모늄 분별 침전, 이온 교환 수지 관 크로마토그래피, 겔 거르기 관 크로마토그래피 들을 거친다. 그런데, 황산 암모늄 분별 침전물을 이온 교환 수지인 DEAE-Sepharose의 관 크

로마토그래피로 더 세분해서 정제하고자 하면 가공 활성이 두드러지게 떨어졌다. 이러한 결과는, 효소 복합체가 높은 농도의 염에 노출됨으로써 쉽게 해리할 수 있는 어떤 성분이 떨어져 나감으로써 생기는 것으로 생각한다. 사실, Apirion 연구진[10]은 RNase III, RNase E, RNase P들이 내부 생체막 구역에 존재하며 이들이 서로 결합하여 복합체를 형성하고 있다는 가설을 내놓았다. M1 RNA의 3' 가공효소도 여러 리보핵산 가수분해효소들과 복합체를 형성하고 있을 가능성이 있으므로, 효소 분획을 가능한 한 높은 염 농도에 노출되지 않게 하고, 가공효소의 물리적 환경의 변화를 최대한 줄이기 위하여 효소 분획을 용액상태로 유지하였다. 이러한 조건에서, S30 분획을 Sephadex G100으로 겔 거르기하고, 겔 거르기에서 얻은 활성 분획을 모아서 DEAE-Sepharose 이온 교환 수지 관 크로마토그라피로 다시 세분하였다. 이 방법으로 세분한 효소 분획들의 활성은 매우 컸다.

본 연구에서는 가공효소를 순수하게 분리하는 데 성공하지 못하였다. 그러나 부분 정제한 효소들을 이용하여 가공효소의 특성과 가공자리를 조사할 수 있었다. S30 분획은 +378의 G 자리와 +379의 A 자리를 절단하였으며, DEAE-Sepharose의 관 크로마토그래피로 얻은 41번에서 50까지의 분획은 +378 과 +379 자리 이외에 +383의 A 자리를 절단하였다. S30 분획보다 더 정제된 DEAE-Sepharose 관 크로마토그래피 분획이 +383 자리를 절단하는 활성을 추가로 나타낸다는 사실은 S30 분획에서는 이 활성이 억제되어 있지만 분획을 더 세분하는 과정에서 이러한 억제 현상이 없어졌기 때문으로 설명할 수 있다. 그러나 이러한 현상은 앞으로 더 연구해야 될 부분으로 생각된다. +378과 +379의 두 절단 자리는, 40% 황산 암모늄 분획으로 우리 연구진과 Altman의 연구진이 조사하여 보고한 절단자리들과 일치한다.[7,8] 그렇지만, +383 자리에서 절단되는 것은 아직까지 보고된 적이 없다. 이 결과에서, 우리는 가공효소 복합체는 적어도 +378과 +379 자리를 절단하는 효소 활성과 +383을 절단하는 두 효소 활성을 가지고 있으며, 선구-M1 RNA의 가공과정은, 먼저 +383이 절단된 다음에 +379 또는 +378 자리가 추가로 절단되는 것으로 추정한다.

DEAE-Sepharose 관 크로마토그라피에서 분리한 가공효소 분획을 Pb^{2+}로 불활성화하였다. 이 불활성화한 분획에 같은 분획에서 추출한 RNA를 첨가하여 주면 가공효소의 활성이 재활성화하였다. 이 결과는 가공효소의 활성에는 어떤 RNA가 필요하다는 것을 의미한다. +383의 A 자리에서 가공활성이 쉽게 재활성화한다는 사실에서 이 자리를 절단하는 가공효소는 쉽게 재구성되거나, RNA와 단백질이 느슨하게 결합되어도 가공 활성을 가지는 것으로 생각된다. 또한 이 분획에서 2가 양이온을 제거하면 가공활성이 없어지므로, 효소 활성에는 2가 양이온이 필요하다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 3' 가공과정에 관여하는 효소를 순수하게 분리하지는 못하였지만, 부분 정제한 효소의 특성을 조사하여 가공효소가 여러 효소들로 이루어진 복합체로 있음을 알 수 있었고, 또 이 가공효소는 RNA를 필요로 한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 RNase P의 성분인 M1 RNA의 가공반응의 메카니즘을 이해하는 실마리가 될 것이며, 앞으로 가공효소를 정제하는 데에도 기초자료가 될 것으로 생각한다.

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비로 연구되었으므로 이에 감사한다. 또한, 연구기간 중 박인원은 서울대학교 1998학년도 연구교수의 혜택을 입었으므로 이에 감사한다.

인 용 문 헌

1. Perry, R. P.(1981) *J. Cell Biol.* **1981**, *91*, 28s.
2. Altman, S.; Baer, M.; Guerrier-Takada, C.; Reed, R. E. In *Gene Regulation*; O' Malley, B., Ed.; Academic Press: New York, U. S. A., 1982; p 207.
3. Altman, S. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1989**, *62*, 1.
4. Gurevitz, M.; Jain, S. K.; Apirion, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80*, 4450.
5. Sakamoto, H.; Kimura, N.; Shimura, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80*, 6187.
6. Reed, R. E.; Altman, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80*, 5359.
7. Lundberg, U.; Altman, S. *RNA* **1995**, *1*, 327.
8. Kim, S.; Kim, H.; Park, I.; Lee, Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19330.
9. Ehretsman, C. P.; Carpousis, A. J.; Krisch, H. M. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 149.
10. Miczak, A.; Srivastava, R. A. K.; Apirion, D. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 1801.

11. Mudd, E. A.; Carpousis, A. J.; Krisch, H. M. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 873.
12. Mudd, E. A.; Krisch, H. M.; Higgins, C. F. *Mol. Microbiol.* **1990**, *4*, 2127.
13. Kim, S; Sim, S.; Lee, Y. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* , 895.
14. Lee, S. J.; Jung, Y. H.; Park, C.-U.; Lee, Y. *Mol. Cells* **1991**, *1*, 415.
15. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2nd Ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, U. S. A., 1989.
17. Donis-Keller, H.; Maxam, A. M.; Gilbert, W. *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2527.
18. Donis-Keller, H. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 3133.
19. Peattie, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 1760.