

Pb(II) 이온을 이용한 *Pseudomonas alcaligenes* 5S rRNA의 고차원 구조 분석

金尚範 · 李永勳[†] · 朴仁源*

서울대학교 자연과학대학 화학과, [†]한국과학기술원 화학과
(1995. 1. 4 접수)

Analysis of Higher Order Structure of 5S rRNA from *Pseudomonas alcaligenes* by using Pb(II) Ion

Sangbumn Kim, Younghoon Lee[†], and Inwon Park*

Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

[†]Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received January 4, 1995)

요약. Pb^{2+} 을 *Pseudomonas alcaligenes* 5S rRNA의 구조 분석에 응용하였다. Pb^{2+} 이 5S rRNA를 절단하는 방식은 5S rRNA의 삼차구조의 조사에 이용할 수 있을 것으로 기대되는 몇 가지 특징들을 보였다. Pb^{2+} 은 안정한 나선형 줄기들에는 작용하지 않는다. 단일가닥으로된 구역들 또는 내밀린 부분들은 그들의 분자내에서의 위치에 따라 다른 민감도로 작용을 받는다. 불안정한 d 나선은 전혀 작용을 받지 않는다. 불안정한 C 줄기에서는 3'쪽의 가닥만이 작용을 받고 5'쪽의 가닥은 작용을 받지 않는다. Pb^{2+} 에 의한 절단과 *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA의 구조분석의 결과들에 기초하여 우리는 5S rRNA에서의 삼차상호작용에 대한 작업가설을 제안하였다.

ABSTRACT. We have applied Pb^{2+} to the structural analysis of 5S rRNA from *Pseudomonas alcaligenes*. The mode of Pb^{2+} -induced cleavage on 5S rRNA has shown several specific features which may be utilized for the examination of tertiary structure of 5S rRNA: Pb^{2+} does not attack the stable helical stems; single stranded regions or bulges are attacked in variable susceptibilities depending on the positions of the sequences or the bases on the molecule; unstable helical region d is not attacked at all; only 3' sided strand of unstable helical stem C is weakly attacked, leaving 5' sided strand unattacked. Based on the Pb^{2+} cleavage properties and the structural analysis of *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA, we have proposed a working hypothesis for the tertiary interactions in 5S rRNA.

서 론

원핵생물의 5S rRNA는 리보솜의 50S 소단위체를 이루는 두 RNA 성분들의 하나이다. 5S rRNA의 수용액에서의 고차원 구조에 대해서는 일부 연구진들이 몇 가지 다른 모형들을 제안하고 있다. Ehresmann 연구진에서는 Y자형의 모형을 제안하였고,¹ Nazar의 연구진에서는 룰리풀프형의 모형을 제안하였다.² Nazar의 모형에서는 5S rRNA의 b-C 구역과

d 구역이 5S rRNA의 삼차구조 형성에서 돌짜귀의 구실을 할 것이라고 설명하고 있다. 우리는 Fe(II)-EDTA와 몇 가지 핵산 가수분해효소들을 탐침으로 사용하여 *Xanthomonas celebensis* 5S rRNA의 삼차구조를 분석하여 Nazar의 제안과 비슷한 결과를 얻었다는 것을 보고한 적이 있다.³ 본 연구에서는 b-C 구역과 d 구역이 삼차구조에서 취하는 형태에 관해 더 자세한 정보를 얻기 위해서 Pb^{2+} 을 탐침으로

사용하여 5S rRNA의 구조를 분석하였다. Pb^{2+} 은 RNA의 단일가닥 부분 중에서도 특히 유연한 부분에 작용하여 포스포디에스테르 결합을 가수분해한다. Pb^{2+} 에 의한 RNA의 절단은 탈양성자화된 Pb^{2+} 의 수화물이 리보오스의 2'-OH로부터 양성자를 제거함으로써 촉진되는 것으로 설명되고 있다.⁴

실 험

5S rRNA의 추출 및 정제

Sogin 등의 방법⁵을 약간 변형하여 5S rRNA를 추출 정제하였다.⁵ 먼저 배양배지에서 수확한 세포를 10 mL의 추출용 완충용액(0.1 M NaOAc, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.2% 벤토나이트; pH 5.0)에 혼탁시키고 상온에서 1시간 동안 세차게 혼들어 준 후에 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액을 페놀로 추출한 후, 5S rRNA를 에탄올로 침전시켰고, 이것을 폴리아크릴아미드 겔 전기이동법으로 분리, 정제하였다.

5S rRNA의 고차원 구조 분석

효소 탐침을 이용한 방법. Brunel 등의 방법에 따라 5S rRNA를 효소 탐침들로 분석하였다.¹ 단일 가닥에 특이한 효소로서는 핵산 가수분해효소 S1을 사용하였고 이중나선에 특이한 효소로서는 V1을 사용하였다. 5' 또는 3' 말단이 ^{32}P 로 표지된 5S rRNA를 복원 완충용액(50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 270 mM KCl; pH 7.5) 10 μ L에 녹인 다음, 65 °C에서 5 분간 가열하고 서서히 상온까지 식혀서(1 °C/min) 5S rRNA의 자연상태의 구조로 복원시킨 후, 운반체 tRNA(5 μ g/ μ L) 1 μ L와 적당한 농도의 효소용액 1 μ L를 가하고 25 °C에서 30분간 반응시켰다.

Pb^{2+} 을 사용한 가수분해 반응. Sogin 등의 방법⁵을 사용하여 5S rRNA의 5' 또는 3' 말단을 ^{32}P 로 표지하였다. ^{32}P 로 표지된 5S rRNA를 복원 완충용액 A(25 mM Na-Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl) 또는 복원 완충용액 B(25 mM Na-Hepes, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 270 mM KCl)에 녹인 다음, 60 °C에서 5분간 가열하고 서서히 상온까지 식혀서(1 °C/min) 5S rRNA의 자연상태의 구조로 복원시킨 후, 운반체 tRNA(5 μ g/ μ L) 2 μ L과 Pb(OAc)₂ 용액을 최종농도가 0.01, 0.1, 1, 10 mM되게 가하고 25 °C에서

15분간 반응시켰다. 반응용액에 10 mM EDTA를 함유하는 시료신기 용액을 가하여 반응을 중지시켰다.

절단된 위치들의 분석. 에탄올로 침전시킨 조각들을 동결건조시켜서 이것을 우레아-염료 완충용액에 다시 용해시킨다. 이 용액을 90 °C에서 30초 동안 가열한 다음에 8.3 M 우레아를 포함하는 12% 폴리아크릴아미드 겔(30 cm × 40 cm × 0.05 cm)에서 전기이동으로 분리하였다.⁶

결과 및 고찰

5S rRNA를 Pb^{2+} 으로 가수분해하여 얻은 RNA 조각들을 전기이동으로 분리한 결과를 Fig. 1에 나타내었고, 핵산 가수분해효소들로 가수분해하여 얻

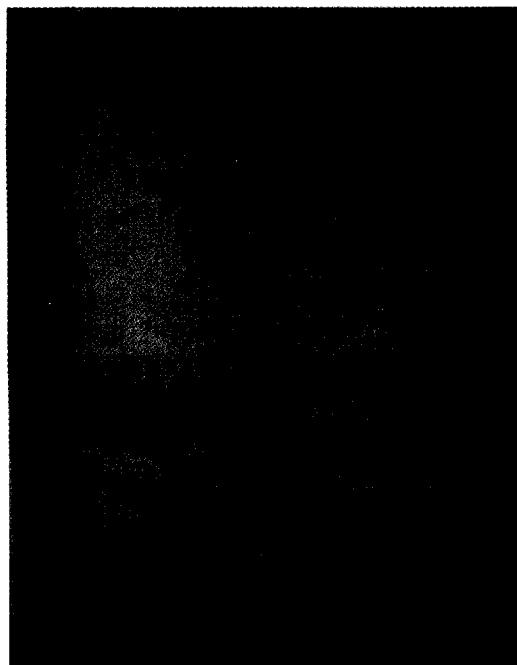


Fig. 1. 12% polyacrylamide gel electrophoresis fractionation of the 3'-end labeled 5S rRNA after Pb(II)-induced hydrolysis.: Reactions were performed in the presence of Pb(II) acetate at the final centratons of 0.01 mM (lanes 1), 0.1 mM (lane 2 and lane 5), 1 mM (lane 3 and lane 6) and 10 mM (lane 4 and lane 7) in buffer A (lanes 1 to 4) and buffer B (lanes 5 to 7). Lane C, incubation control; lanes T1 and OH, RNase T1 and alkali ladders, respectively. The Sequence is numbered by every G residue.

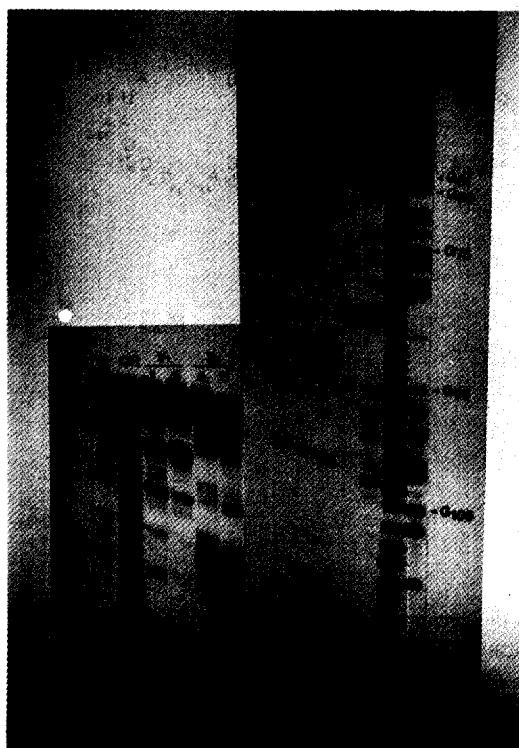


Fig. 2. 12% polyacrylamide gel electrophoresis fractionation of the 3'-end labeled 5S rRNA after enzymatic hydrolysis. Lanes 1 to 3, RNase V1 for 5, 10, 15 min; lanes 4 and 5, nuclease S1 at pH 7.5, pH 4.5, respectively; lanes T1 and OH, RNase T1 and alkali ladders, respectively. The Sequence is numbered by every G residue.

은 RNA 조각들을 전기이동으로 분리한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 결과들을 *P. alcaligenes* 5S rRNA의 이차구조 모형에 종합해서 나타내었다(Fig. 3). 전반적으로 보면, Pb²⁺에 의한 가수분해 반응은 5S rRNA가 안정한 삼차구조를 형성한 후 수용액 환경으로 노출되는 단일가닥 부분에서 선택적으로 일어나는 경향을 보였다. 이것은 다음의 두 가지 관찰들에서 알 수 있다. 첫째, Mg²⁺과 Na⁺의 농도를 증가시키면 Pb²⁺에 의한 가수분해 반응에 대한 5S rRNA의 저항성이 증가한다(Fig. 1의 1~4 분리줄들과 5~7 분리줄들을 비교하라). 둘째, 리보핵산 가수분해효소 V1이 작용하는 나선형 줄기들(A, B, D, E)은 Pb²⁺으로 가수분해되지 않지만, 핵산 가수분해효소 S1들이 작용하는 단일가닥 부분들(a, b, c,

e)은 많은 자리들에서 Pb²⁺으로 세게 가수분해된다. Pb²⁺에 의한 *P. alcaligenes* 5S rRNA의 절단 결과를 더 자세히 살펴 보면 다음과 같다.

A, B, C, D, E 줄기들

앞에서 이미 말한 바와 같이, 이 줄기들은 Pb²⁺에 의한 가수분해 반응을 받지 않는다(Fig. 3 참조). 다만 A₁₁₆-G₁₁₇ 포스포디에스테르 결합이 리보핵산 가수분해효소 V1과 Pb²⁺에 의해서 모두 약하게 절단되는데, 그 이유는 불안정한 U₃:G₁₁₇ 비표준형 염기쌍이 이 5S rRNA 분자의 말단 부분에 위치하고 있기 때문으로 생각된다. B 줄기에서 A₆₆의 내밀린 구조 앞뒤의 포스포디에스테르 결합들이 Pb²⁺으로 약하게 절단되지만 B 줄기의 나머지 결합들은 절단되지 않는다. 이 결과로 보아 A, B, D, E 줄기들은 5S rRNA 분자의 삼차구조에서 나선형 구조를 유지하며, B 줄기의 A₆₆은 내밀린 구조를 유지하면서 수용액 환경으로 다소 노출되어 있음을 알 수 있다. Pb²⁺이 C 줄기에 작용하는 방식은 특이하다. 이 줄기의 5'쪽 가닥, 즉 C₂₈ACCUGU₃₄ 연속부분은 Pb²⁺으로 절단되지 않는데 반해서 3'쪽 가닥, 즉 A₄₈CGGAAGUC₅₆ 연속부분에서는 내밀린 구조 A₅₂-A₅₃ 결합이 세게 절단되고 그 밖의 결합들이 거의 모두 약하게 절단된다. 이 결과는 C 줄기의 염기쌍들이 불안정하게 결합되어 있음을 암시한다. 이러한 사실은 앞서 15 가지 종류의 *Pseudomonas*와 *Xanthomonas*의 5S rRNA들에 대해서 우리가 제안한 이차구조 모형과도 잘 일치한다.⁷ 우리의 이러한 관찰은 Ciesiolka 등⁵이 *Thermus thermophilus*와 *Bacillus stearothermophilus*의 5S rRNA들의 구조를 Pb²⁺으로 분석한 결과와 일치하지만 *E. coli*의 5S rRNA를 분석한 결과와는 일치하지 않는다. 후자의 경우에는 C 줄기의 포스포디에스테르 결합들이 Pb²⁺으로 쉽게 절단되는 경향을 보였다.

a, e 고리들

a 고리와 e 고리의 포스포디에스테르 결합들은 이웃하고 있는 줄기들과의 접촉 부위들을 제외하고는 거의 다 Pb²⁺에 의해서 세게 절단된다. 이것은 5S rRNA의 삼차구조에서 이 두 고리들이 수용액 환경으로 노출되어 있음을 암시한다. a와 e 고리들이 수용액 환경으로 노출된다는 것은 *Xanthomonas* 종들의 5S rRNA들에서도 관찰되었다.^{7~10}

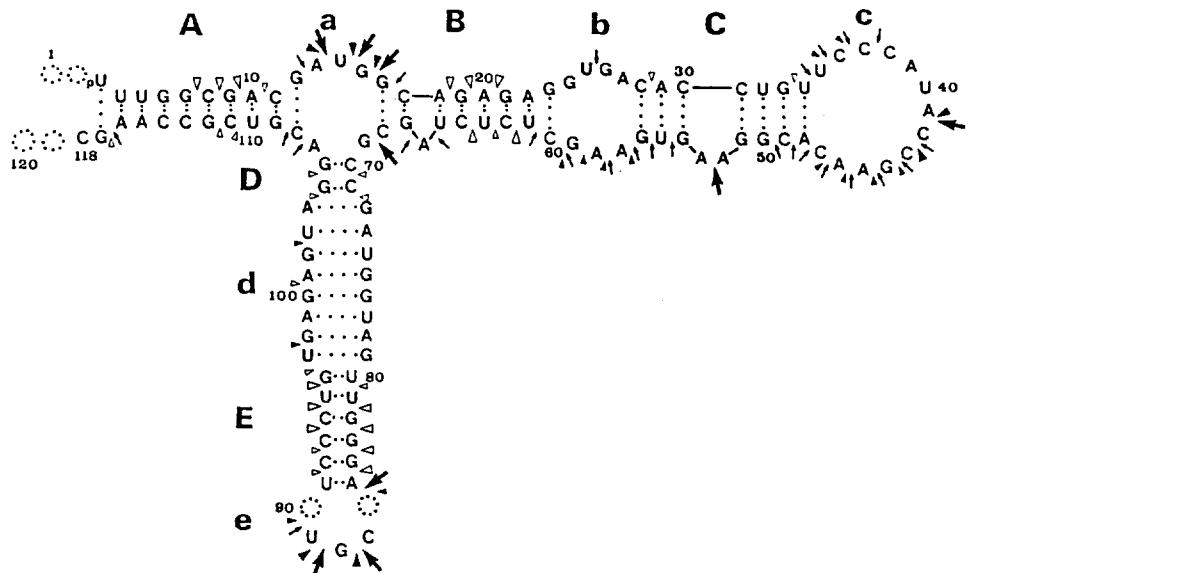


Fig. 3. Summary of the probing experiments represented on the secondary structure of *P. alcaligenes* 5S rRNA. The secondary structure used here is that of minor modification of our consensus model for prokaryotic 5S rRNAs.⁷ Enzymatic accessibilities of RNase V1 cuts, strongly (\triangleright) and weakly (\succ). Nuclease S1 cuts, strongly (\blacktriangleright) and weakly (\bullet). Pb(II)-induced cleavages, strongly (\rightarrow) and weakly (\neg). The dots .. 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 numbering of the sequence.

b, c 고리들

b 고리의 G₂₃GUGAC₂₈ 연속부분은 U₂₅-G₂₆ 결합만이 Pb²⁺으로 약하게 절단되지만, G₅₆AAGC₆₀ 연속부분은 한군데를 제외한 모든 결합들이 Pb²⁺으로 약하게 절단된다. 한편, c 고리는 A₄₁의 5'쪽, 즉 U₃₄UCCCAU₄₀ 연속부분의 앞부분(U₃₄UCC₃₇)은 Pb²⁺으로 약하게 절단되지만 나머지 결합들, 즉 C₃₈-A₃₉, A₃₉-U₄₀, U₄₀-A₄₁ 결합들은 절단되지 않는다. 이와는 대조적으로 A₄₁-C₄₂는 Pb²⁺으로 세게 절단되어 A₄₁ 다음의 3'쪽 연속부분의 모든 결합들이 약하게 절단된다. 이 결과들에서 c 고리는 삼차구조에서 고리를 유지하면서 C₃₇CAU₄₀ 연속부분이 5S rRNA 분자의 일정한 부분과 센 삼차 상호작용으로 염기쌍들을 형성할 것으로 생각되며 A₄₁과 C₄₂ 염기들을 제외한 c 고리의 나머지 염기들(C₄₃, G₄₄, A₄₅, A₄₆, C₄₇)은 c 고리의 단일가닥을 따라 치쌓여 있거나 분자의 다른 부분과 약한 삼차 상호작용을 이를 것으로 추측된다. 이 염기들이 치쌓여 있을 가능성은, α -모의 tRNA^{Ala}의 역코돈 고리에서 치쌓여 있는

G^m₃₄, A₃₅, A₃₆, Y₃₇, A₃₈들이 단일가닥에 있으면서도 Pb²⁺에 의해서 절단되지 않는 사실로 유추할 수 있다.¹¹

불안정한 d 나선

d 나선의 5'쪽 가닥 A₇₃UGGUAG₇₉과 3'쪽 가닥 U₉₇GAGAGU₁₀₃은 모두 Pb²⁺으로 전혀 절단되지 않으며 3'쪽 가닥만이 단일가닥에 작용하는 핵산 가수분해효소 S1과 리보핵산 가수분해효소 V1으로 매우 약하게 절단된다. 이것은 d 나선이 불안정한 나선구조를 형성하고 있다고 이미 보고한 우리의 관찰을 뒷받침하는 것이다.⁷ d 나선에서 G₇₂*A₁₀₄, G₇₅*A₁₀₁, G₇₆*G₁₀₀, A₇₈*G₉₈ 따위 비표준형 염기쌍들이 형성될 수 있다는 의견들은 여러 연구진들이 의해서 제안되었다.^{7,12-15} 또한 Erdmann 연구진이 구성한 진성 박테리아 5S rRNA의 이차구조 모형에서도 A₇₃*U₁₀₃, U₇₄*G₁₀₂ 등이 비표준형 염기쌍을 이룰 수 있음을 제안하였다.¹⁶ 최근에 우리는 *X. cerebencis* 5S rRNA를 안지오제닌으로 분석해 봄으로써 d 나선의 비표준형 염기쌍들의 결합이 약하다는 것

을 관찰하였다.¹⁴ d 나선의 두 가닥들이 Mg^{2+} 이 있는 조건에서 Pb^{2+} 에 의해서 전혀 절단되지 않는 것은 다음의 두 가지 가능한 이유 때문으로 생각된다. 첫째, d 나선에서만 예외적으로 존재하는 A*G 염기쌍들이 Mg^{2+} 들과 결합하여 d 나선의 불안정성을 경감시키는 것으로 생각한다. 둘째, d 나선의 누클레오티드들이 5S rRNA의 다른 부분의 누클레오티드들과 삼차 상호작용을 하는 것으로 생각된다(뒤의 절 참조). A*G 염기쌍을 가진 구조 요소가 Mg^{2+} 들을 결합하는 바구니 역할을 한다는 사실이, 최근에 Pley 등¹⁷이 망치머리꼴 리보효소 결정체를 분석함으로써 밝혀졌다. d 나선이 불안정한 구조를 이루는 것은 *X. citri*¹⁰와 *X. celebencis*³ 5S rRNA들의 d 나선의 아데노신 잔기들이 Mg^{2+} 이 없는 조건에서 모두 피로탄산 이에틸로 카르베톡시화 되는 것으로도 알 수 있다.

줄기와 고리의 접속 부위에 있는 G:C 염기쌍들의 불안정성

$G_{12} : C_{108}$, $G_{16} : C_{68}$, $G_{23} : C_{60}$, $C_{28} : G_{56}$ 염기쌍들은 불안정하다(Fig. 3). 이것은 5S rRNA의 삼차구조 형성에서 a와 b 고리들이 비틀리거나 접힐 때 이 고리들에 생기는 무리한 변형에 기인한 것으로 추측된다. Erdmann 연구진¹⁶이 구성한 진성 박테리아 5S rRNA의 이차구조 모형에서 $G_{23} : C_{60}$ 과 $C_{28} : U_{56}$ 염기쌍들은 불안정하다고 하였으며 줄기와 고리가 접속하는 부위에 있는 G:C 염기쌍들의 불안정성은 *E. coli*의 5S rRNA의 G_{10} 과 C_{110} 사이에서도 일어난다는 것이 15N-핵자기 공명 분광법으로 관찰되었다.¹⁸

5S rRNA의 삼차 상호작용에 대한 작업가설

우리는 *Xanthomonas celebencis* 5S rRNA의 구조 분석에서 a, c, e 고리들이 서로 상호작용한다는 것을 관찰하여 보고하였으며, 이러한 삼차 상호작용이 가능하려면 5S rRNA의 b-C 구역과 d 나선 구역이 5S rRNA의 접힘에서 돌쩌귀와 같은 구실을 할 것이라고 제안한 바 있다.³ b-C 구역과 d 나선 구역이 돌쩌귀의 구실을 할 것이라는 견해는 최근에 Nazar에 의해서도 발표되었다.² 그는 Fe(II)-EDTA와 에틸니트로소 우레아를 탐침으로 사용한 5S rRNA의 구조 분석에서 이러한 결론을 얻었다. 앞에서 기술한 바와 같이, 이 구역들의 5'쪽 가닥은 Pb^{2+} 에 의한

절단을 거의 받지 않는데 반해서, 3'쪽 가닥은 Pb^{2+} 에 의한 절단을 약하게 받는다. 아마도 이것은 3'쪽 가닥의 포스포디에스테르 결합들이 삼차구조상에서 수용액 환경으로 거의 모두 노출되어 있고, 5'쪽 가닥은 5S rRNA의 분자 안쪽으로 묻혀 있거나 이 가닥의 누클레오티드들이 다른 연속부분과 삼차 상호작용을 하기 때문일 것으로 추측된다. 내밀린 구조의 $A_{52}-A_{53}$ 결합이 Pb^{2+} 에 의해서 매우 예민하게 절단되는 사실이 이러한 견해를 뒷받침하는 것으로 생각한다. 이러한 사실들에서 우리는 b-C 구역은 5S rRNA의 이차구조에서 볼 수 있는 구조 요소들을 크게 변형하지 않고 유지하면서 돌쩌귀의 구실을 하는 것으로 생각한다.

d 나선의 포스포디에스테르 결합들이 Pb^{2+} 에 의한 절단을 전혀 받지 않는 이유는 아직 분명치 않다. 아마도 $G_{75}GUAG_{79}$ 연속부분과 c 고리의 $C_{37}CAUAC_{42}$ 연속부분이 평행하게 또는 역평행하게 호그스텐 염기쌍들을 형성하여 d 나선 부분과 삼중나선을 이루기 때문에 그런 것이 아닌가 상상된다. 그렇지만, 이러한 삼중나선 구조가 형성되더라도 A_{41} 은 염기쌍을 이루지 못하여 내밀리게 되므로 $A_{41}-C_{42}$ 포스포디에스테르 결합이 Pb^{2+} 에 의해서 강하게 절단되는 것으로 생각된다. a 고리의 대부분($A_{13}UGG_{16}$)과 e 고리의 $C_{87}GU_{89}$ 연속부분은 수용액 환경에 노출되어 있지만 a 고리의 G_{12} , A_{107} , C_{108} , 누클레오티드들과 e 고리의 U_{89} 누클레오티드는 c 고리와의 삼차 상호작용에 관계하고 있을 것으로 추정된다. 이러한 추측은 *X. celebencis* 5S rRNA의 c 고리의 $U_{35}CC-CAU_{40}$ 연속부분에 상보적으로 결합할 수 있는 데 옥시헥사머 ATGGGA를 사용한 구조 분석에서 알 수 있었다.²

앞에서 이미 기술한 바와 같이, A, B, D, E 줄기들은 매우 안정한 성질을 보였다. 그러므로 이 줄기들은 5S rRNA의 삼차구조 형성에서 기본 요소들이 될 것으로 생각한다.

본 연구는 1993년도 교육부 기초과학 육성 연구비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사하는 바이다.

인용 문헌

- Brunel, C.; Romby, P.; Westhof, E.; Ehresmann,

- C.; Ehresmann, B. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 293.
2. Nazar, R. N. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4562.
3. 조봉래; 이영훈; 최명언; 박인원 *대한화학회지* **1993**, *37*, 237.
4. Brown, R. S.; Dewan, J. C.; Klug, A. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4785.
5. Ciesiolka, J.; Lorenz, S.; Erdmann, V. A. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 575.
6. Sogin, M. L.; Pace, B.; Pace, N. R. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1350.
7. 조봉래; 이승주; 심윤보; 고문주; 박인원 *대한화학회지* **1993**, *37*, 364.
8. 조봉래; 고문주; 임자혜; 박인원 *한국생화학회지* **1991**, *24*, 55.
9. 조봉래; 최명언; 서세원; 임자혜; 고문주; 박인원 *대한화학회지* **1993**, *36*, 460.
10. 심윤보; 조봉래; 이영훈; 박인원 *한국생화학회지* **1994**, *27*, 466.
11. Krzyzosiak, W. J.; Marciniec, T.; Wiewiorowski, M.; Romby, P.; Ebel, J. P.; Giege, R. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5771.
12. Traub, W.; Sussman, J. *Nucleic Acid Res.* **1982**, *10*, 2701.
13. 고문주; 박인원; 이강렬 *한국생화학회지* **1988**, *21*, 195.
14. 김상범; 조봉래; 임자혜; 장수익; 박인원 *대한화학회지* **1994**, *38*, 769.
15. Zhang, P.; Moore, P. B. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4607.
16. Woiters, J.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acid Res.* **1988**, supplement *16*, r1.
17. Pley, H. W.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B. *Nature* **1994**, *372*, 68.
18. Gewirth, D. T.; Abo, S. R.; Leontis, N. B.; Moore, P. B. *Biochemistry* **1987**, *26*, 5213.