

홀몬으로 처리된 쥐의 C₆ glioma 세포배양으로부터 분리된
낙산탈수소 효소 A-mRNA의 3'-말단의 2 차 구조

배석철 · 이승기

서울대학교 약학대학 생화학교실

Characterization of the Folding Structure of 3'-end of Lactate Dehydrogenase A-mRNA Isolated from Hormone Stimulated Rat C₆ Glioma cell culture.

Bae, S.C. and S.K. Lee

Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

ABSTRACT: Rat liver LDH A-cDNA has been isolated from a λ gt11-rat liver cDNA library and partially characterized. The size of the isolated rat liver LDH A-cDNA is shown to be 1.6 Kb and restriction enzyme sites for the rat liver LDH A-cDNA are also mapped. 682-nucleotide sequence coding for 3'-end of rat liver LDH A-cDNA has been analyzed and compared to the nucleotide sequence of the same region of rat C₆-glioma cell LDH A-cDNA which has been cloned from the hormonally stimulated cell cultures. The result shows that 177 nucleotide sequences coding for the C-terminal 59-amino acids are identical but 505 nucleotide sequences of 3'-nontranslated region of the two LDH A-cDNA exhibit characteristic differences in their nucleotide sequences. Computer analysis for the folding structures for 3'-end 400 nucleotide sequences of the two LDH A-cDNA shows a possibility implying that the two LDH A-mRNAs isolated from different tissues of rats may have different half life and therefore their translational efficiency may be different.

It has been previously demonstrated that isoproterenol stimulated rat C₆-glioma cell cultures produce LDH A-mRNA showing 2 to 3-fold longer half life in comparison to that of noninduced LDH A-mRNA. The result therefore support for the idea that hormonally stimulated rat C₆-glioma cells may produce LDH A-mRNA containing different nucleotide sequences at the 3'-end nontranslated region by which the hormonally induced LDH A-mRNA could have more stable secondary mRNA structure in comparison to that of noninduced LDH A-mRNA.

KEY WORDS □ Rat C₆ glioma cell, folding structure of LDH A-mRNA, hormonal regulation.

LDH(Lactate Dehydrogenase)는 A, B, C 세 가지 type의 subunit 등이 동물조직에 존재하는데 adult testis에서만 발견되는 C-type을 제외한 A와 B-type은 여러조합에 의해 LDH-1(B₄), LDH-2(AB₃), LDH-3(A₂B₂), LDH-4(A₃B), LDH-5(A₄) 등의 다섯 가지 isozyme 형태로 존재하고 있다. LDH isozyme들은 tissue specific 하게 분포하고 있으며 각기 다른 physico chemi-

cal property 를 나타내고 있다(Markert CL, Appella E, 1961). 쥐의 뇌에서 분리한 Rat C₆ glioma cell에는 3 종의 LDH isozyme이 있음이 밝혀졌는데 LDH-3, LDH-4, LDH-5가 각각 10%, 20%와 70%로 존재하며 주로 LDH-5가 존재하는 것이 확인됐다(Derda *et al.*, 1980). 또한 rat C₆ glioma cell culture 중에서 catecholamine 또는 dibutyryl cAMP로 처리할 때에

isozyme의 상대적 비율이 현저히 변화되며 LDH-5가 전체 LDH 활성의 85% 이상으로 증가되어 hormone 및 cAMP에 의해 효소활성이 induction됨이 보고된 바 있다 (Derda *et al.*, 1980; Kumar *et al.*, 1980). Northern blot과 hybridization kinetic study에 의한 결과에 따르면 LDH A-mRNA의 농도는 홀몬처리 후 2 배 증가하였으며 이들의 *in vitro* translation 분석결과 functional LDH A mRNA의 활성은 8-10배 증가한 것으로 나타나 hormone stimulation에 의해 유도된 LDH A-mRNA의 translation efficiency는 4-5배 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Derda *et al.*, 1980; Milles *et al.*, 1981). 따라서 LDH-5 활성의 상대적 비율의 변화는 LDH-A subunit mRNA의 농도증가에 기인하며 이런 농도증가에는 LDH A-mRNA의 반감기가 약 3배 (45분에서 2.5시간으로) 증가한 것이 한 원인으로 관여하고 있음이 밝혀졌다 (Jungmann *et al.*, 1983). Hybridization kinetics의 결과에 따르면 isoproterenol로 stimulation한 rat C₆ glioma cell culture로부터 분리한 LDH-cDNA(LDH A cDNA_{stim})는 control poly(A⁺) mRNA 보다 poly(A⁺) mRNA_{stim}에 대하여 더 높은 homology를 보여주고 있어서 (Miles *et al.*, 1981) hormone으로 자극한 조직과 자극하지 않은 조직의 LDH A-mRNA 간에는 구조적인 차이가 있을 것이라고 제시된 바 있다.

최근에 보고된 바에 의하면 eukaryotic mRNA의 3'-말단의 비번역 부위에 있어서 poly adenylation signal(AAUAAA)을 전후로 한 염기배열순서가 mRNA를 분해하는 효소인 RNase에 대한 susceptibility를 결정하는 중요한 요소라는 결과 (Shaw and Kamen., 1986)가 발표된 바 있다.

따라서 홀몬으로 처리된 rat C₆ glioma cell culture 중에서 induce된 LDH A-mRNA가 control에 비해 translational efficiency가 증가되고 또한 반감기가 증가된 이유중의 하나는 induced LDH A-mRNA의 3'-말단의 비번역 부위의 염기배열순서가 control LDH A-mRNA에 비해 차이가 나고 따라서 이 부위의 folding structure가 RNase의 공격을 억제할 가능성이 시

사되고 있다.

이와같은 가능성을 검토하기 위해 본 연구에서는 홀몬으로 처리하기 전후에 생성된 LDH A-mRNA의 3'-말단 비번역부위의 염기배열순서와 folding structure를 비교 검토하기 위해 일차적으로 isoproterenol로 처리한 rat C₆ glioma와 동일 species인 rat의 정상 liver로부터 cloning하여 분리한 LDH A cDNA의 3'-말단 682 염기배열순서를 분석하였으며 이를 토대로 computer 분석을 통한 3'-말단의 400 nucleotide의 folding structure를 비교 검토하였다. 본 연구결과 이들 LDH A-mRNA의 3'-말단 염기배열순서는 특징적인 차이를 보여주었을 뿐 아니라 서로 상이한 secondary structure를 보여주고 있음이 밝혀져 rat의 경우 LDH A-mRNA는 최소한 조직 특이적으로 3'-말단의 염기배열이 다른 LDH A-mRNA가 생합성되고 있음을 확인할 수 있었다. 이와같은 결과로 미루어 볼때 rat에서는 조직특이적으로 반감기가 다른, 따라서 이들의 translation efficiency가 다른 LDH A-mRNA가 존재할 가능성이 제시되고 있다. 또한 홀몬으로 처리한 후에 생성되는 LDH A-mRNA가 control에 비해 반감기가 증가되는 mechanism의 하나는 홀몬처리 후 이들 3'-말단의 염기배열순서가 다른 LDH A-mRNA가 생합성되기 때문일 가능성도 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시 약

IPTG(Isopropylthiogalactoside)는 Sigma에서, X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)는 BRL에서, [α -³²P] dATP (3000 Ci/mole, 10 μ Ci/ μ l)는 NEN으로부터 구입하였다. 배지에 필요한 시약은 Difco 제품을 그리고 기타 buffer를 만드는 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

Plasmids

pRLD 42: isoproterenol로 stimulation한 rat C₆ glioma cell로부터 polysomal mRNA를 분리하여 pBR 322에 cloning하여 얻은, LDH A-subunit poly(A⁺) mRNA의 3'-end의 약 700 bp를 coding하는 cDNA를 포함하는 plasmid이다

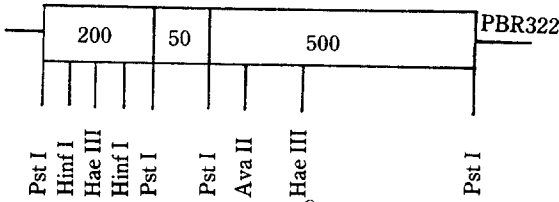


Fig. 1. Restriction map of pRLD42.

(Fig.1).

pWR 34: polylinker region 전후에 M13 reverse sequencing primer와 Universal primer의 complementary sequence를 가져서 sequencing에 이용할 수 있는 plasmid이며 marker로서 Amp^r와 Lac Z gene을 가지고 있다 (Fig.2).

pRLD 42의 Subcloning

pRLD 42의 분리정제는 Triton-Lysozyme 방법 (Leonard G. Davis, 1986)에 의하여 하였다.

분리한 pRLD 42를 Pst I으로 처리한 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 각각의 cDNA band (500 bp, 200 bp, 50 bp)를 절취하여 activated DEAE membrane에 각각 전기영동적인 방법으로 transfer하여 분리하였다. 분리정제한 각각의 cDNA 절편을 T4 DNA ligase를 이용하여, Pst I으로 처리한 pWR 34 plasmid에 cloning하였다. 각각의 ligation mixture를 calcium chloride 방법 (Maniatis *et al.*, 1982)에 따라 제조한 JM 83(r-) competent cell을 transformation하고 IPTG, X-Gal 및 ampicillin을 함유한 L-B agar plate에 spreading 하였다.

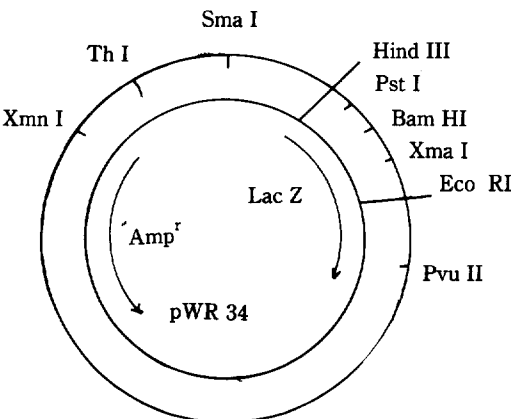


Fig. 2. Restriction map of pWR 34.

ampicillin 내성 white colony를 취하여 recombinant plasmid를 분리정제하고 Pst I 처리한 후 subclone된 cDNA 절편을 확인하였다.

Rat liver LDH A-cDNA의 분리 및 Subcloning

Rat liver poly(A⁺) RNA로부터 제조한 cDNA library에서 plaque hybridization 방법에 의해 (Leonard G. Davis, 1986) pRLD 42를 probe로 하여 LDH A-cDNA의 존재를 분석하였다. 분리된 plaque로부터 λ gt 11-recombinant DNA를 분리 정제하고 EcoR I으로 절단한 다음 EcoR I으로 처리한 pWR 34 plasmid에 subcloning하여 pWRL-1.6 K recombinant plasmid를 제조하였다.

LDH A-cDNA 염기배열순서의 분석

Subclone된 plasmid를 직접 사용하여 Sanger (1977)의 dideoxy chain termination 방법에 의해 염기배열순서를 동정하였다.

LDH A-mRNA의 2 차 구조 분석

Zuker 등 (1981)이 개발한 computer program을 이용하여 LDH A-mRNA의 2 차 구조를 분석하였다.

결과 및 고찰

Rat liver LDH A-cDNA의 분리 및 subcloning

Plaque hybridization 방법에 의해 rat liver λ gt 11-cDNA library로부터 pRLD 42를 probe로 하여 분리한 DNA-recombinant에서 EcoR I 처리 후 1.6 Kb의 LDH A-cDNA 절편을 얻을 수 있었다. 이 LDH A-cDNA 절편을 pWR 34 plasmid의 EcoR I cloning site에 삽입시켜 pWRL-1.6 K recombinant DNA를 제조하였다.

Subclone된 pWRL-1.6 K plasmid를 EcoR I, Pst I-처리 후 southern blot 분석에 의해 1.6 Kb insert가 LDH A-cDNA임을 확인하였다 (Fig.3). subclone된 1.6 Kb LDH A-cDNA를 EcoR I, Xho II, EcoR V, Bcl I, Pst I, Sph I, Bgl II 등의 제한효소로 분해하여 제한효소 지도를 작성하였다 (Fig.4). 1.6 Kb LDH A-cDNA의 염기배열 순서를 분석하기 위해 Pst I과 EcoR I 제한효소로

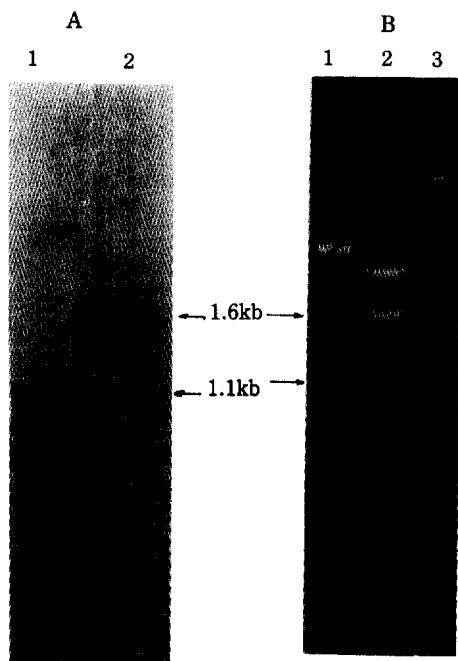


Fig. 3. Southern Blot Analysis of LDH A-cDNA isolated from rat liver λ gt 11-cDNA library.

A shows the autoradiogram obtained from the southern blot analysis using pRLD 42-(180 bp) as a probe, which is coding for C-terminal amino acids of LDH A-subunit. B shows restriction enzyme digested pattern of rat liver LDH A-cDNA separated on 1.5% agarose gel. Lanes 1, 2, 3 indicate PstI, EcoRI-digested LDH A-cDNA and DNA molecular weight markers respectively.

처리하여 얻은 0.5 Kb, 1.1Kb의 두 cDNA 절편을 pWR 34 plasmid에 각각 subcloning 하였다 (Fig.5).

LDH A-cDNA 염기배열순서

Sanger의 dideoxy chain termination 방법에 의해 sequencing한 rat liver LDH A-cDNA 염

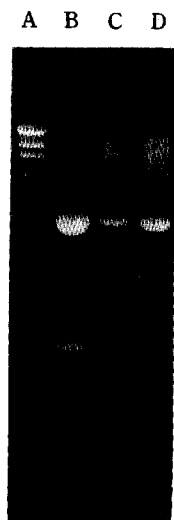


Fig. 5. Identification of subcloned LDH A cDNA (rat liver) 1.1 kb and 0.5 kb DNA fragments.

PstI, EcoRI double digested pWRL-1.6 K (B), EcoRI, PstI double digested pWRL-1.1 K (C), PstI, EcoRI double digested pWRL-0.5 K (D) and Hind III digested λ DNA (A) were electrophoresed on 1.5% agarose gel.

기배열순서와 isoproterenol 처리한 rat C₆ glioma cell LDH A-cDNA의 염기배열순서를 비교한 결과 Fig.6에 표시되어 있는 바와 같다. termination codon TAA와 polyadenylation signal로 추정되는 AATAAA의 hexanucleotide를 확인할 수 있었다. termination codon 5' 위치에 존재하는 177개 염기배열순서로부터 59개의 아미노산을 coding하는 염기배열순서가 두 cDNA에 있어서 동일함이 밝혀졌으며 이들 부위의 59개의 아미노산 배열순서는 rat liver에서 분리한 LDH A-subunit의 C-terminal 아미노산 배열순서와 일치하였다 (Steven *et al.*, 1982).

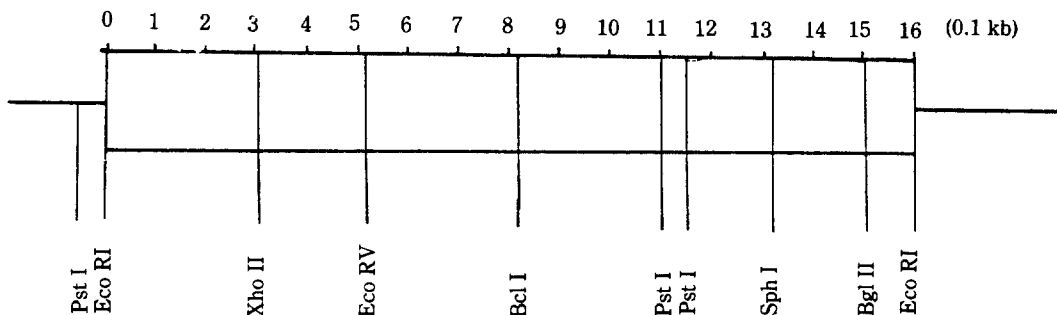


Fig. 4. Restriction Enzyme Map of pW RL-LDH A cDNA.

```

A:  TCCACCATG*ATTAAGGGTCT*CTATGGAAT*CAAGGAGGAT*GTCTTCCTCAG*CGTCCCATG*T
B:  TCCACCATGATTAAGGGTCTCTATGGAATCAAGGAGGATGTCTTCCTCAGCGTCCCATGT
    ATCCTGGGAC*AAAATGGAAT*CTCAGATGT*TGTGAAGGTG*ACTGACTC*TGACGAGGAG*
    ATCCTGGGACAAAATGGAATCTCAGATGTTGTGAAGGTGACTGACTCCTGACGAGGAG
    GCCCGCCTG*AAGAAGAGTGC*AGATACCC*TGGGGAACT*CAGAAGGAGC*TGCAGTTC*TAA*
    GCCCGCCTGAAGAAGAGTGCAGATACCC*TGGGGAACTCAGAAGGAGCTGCAGTTC*TAA*
    AGTCTTCCC*AGTGTCTTAG*CACTTCACT*GTCAGGCTGC*CAGCAGGGTT*TCTATGGAG*C
    ACTC-TTCCAGTGTCTTAGCACTT*CACTGTCCAGGCTGCAGCAGGGTTTCTATGGAGAC
    CACGCACTT*CTCATCTGAG*CTGTGGT*-----*TGGT*CAGTTGTGT*TGAGGTGGTCT*
    CACGCACTTCTCATCTGAGCTGTGGT*TACTCCAGT*TGGTCCAGTTGTGTTGAGGTGGTCT
    GGGGAAAT*CTCAGTTCCA*CAGCTCTACCC*TGCTAAGTGC*TACTTGTGT*ACTGGTAAC*T
    GGGGAAATCTCAGTTCCACAGCTCTACCC*TGCTAAGTGC*TACTTGTGTACTGGTAAC*T
    GGTTAGTGT*CACAATCCCA*CTGTCTCCA*AGACACACTGCC*AACTGCATGC*AGCT-TTGA*T
    GGTTAGTGTCAACAATCCCACTGTCTCCAAGACACACTGCCAACTGCATGCAGGTCTTGAT
    TACCCTGTG*AGCCTGCTGC*ATTGCTC*-----*CGCACCC*TACCAACATGC*-TAGGCCA*T
    TACCCTGTGAGCCTGCTGCATTGCTC*TGCTACGCACCC*TACCAACATGCCTAGGCCAT
    GAGTCCCAG*TTAGTTATA*AGCTGGCTCC*AGTGTGTAAG*TCCATCGTGC*ATATCTTGTGC*
    GAGTCCCAGTTAGTTATAAGCTGGCTCCAGTGTGTAAGTCCATCGTGTATATCTTGTGC
    ATAAATGTT*CTACAGGATA*TTTTCTGTATT*TATATGTGTCT*TGTAGTGTAC*ATTGCAATAT*T
    ATAAATGTTCTACAGGATATTTTCTGTATTATATGTGTCTGTAGTGTACATTGCAATATT
    ATGTGAAAT*GTAAGATCTGC*ATATGGATG*ATGGAACCA*AACCACTCAAGT*GTGCATGCCA*AG
    ACGTGAAATGTAAGATCTGCATATGGATGATGGAACCAACCACTCAAGTGTGCATGCCAAG
    GAAAACACC*AAATAAACCT*TGAACAGTGA*GTGATTG*AAAA*AAAA
    GAAAACACCAAAATAAACCTTGAACAGTGT-----AAAA*AAAA
    
```

Fig. 6. Comparison of C-terminal Amino Acid Coding Sequences and 3'-Untranslated Sequences of isoproterenol stimulated C₆ glioma cell LDH A cDNA (A) and Rat liver LDH A cDNA (B).

LDH A-mRNA의 3'-말단 비번역 부위의 염기 배열순서를 검토해 본 결과 rat glioma cell LDH A-cDNA는 505 bp였으며 rat liver LDH A-cDNA는 511bp임이 밝혀져 rat liver LDH A-cDNA가 6bp 더 긴 것으로 나타났다(Fig.6).

또한 3'-말단 비번역 부위에 있어서 두 LDH A

-cDNA는 95%의 homology를 나타내었는데 특기할 사항은 두 염기배열순서에서 9, 5와 8bp의 계속된 염기배열이 첨가 또는 제거된 특징을 나타내고 있어 이 두 LDH A mRNA는 조직 특이적으로 또는 홀몬 자극에 의해 LDH A-유전자의 다른 부위에 coding 됐을 가능성을 제시하여 매우

흥미로운 결과를 보여주고 있다.

LDH A-mRNA의 3'-말단 400 base-2 차 구조 분석

이들 염기배열순서의 차이에 의하여 3'-말단부위의 mRNA 2 차 구조의 특징을 살펴보기 위하여 computer 분석을 한 결과 Fig.7에 도시한 바와 같이 이 두 LDH A-mRNA의 3'-말단의 2 차 구조는 특이한 차이를 보여주고 있음을 알 수 있었다.

특히 poly(A) addition signal 주위에 있어서 LDH A mRNA (stim)은 stem loop 구조를 형성하고 있는데 반하여 LDH A-mRNA(rat liver)는

single strand로 존재하고 있어 이 두 LDH A-mRNA는 분해효소인 RNase의 공격에 대한 서로 상이한 안정성을 보일 가능성을 제시하고 있다.

Eukaryotic mRNA의 3'-비번역 부위의 염기배열순서는 post transcription 단계에서 유전자 발현조절에 있어서 중요한 정보를 포함하고 있다는 증거들이 계속 보고되고 있다. 즉 cytosol에 존재하는 많은 mRNA는 종류에 따라 각기 고유한 반감기를 가지며 (Koch, H. 1979; Chia, L. L., 1979; Fuchs, R.P.P., 1983), 하나의 cell에 다양한 반감기의 mRNA가 함께 존재하므로

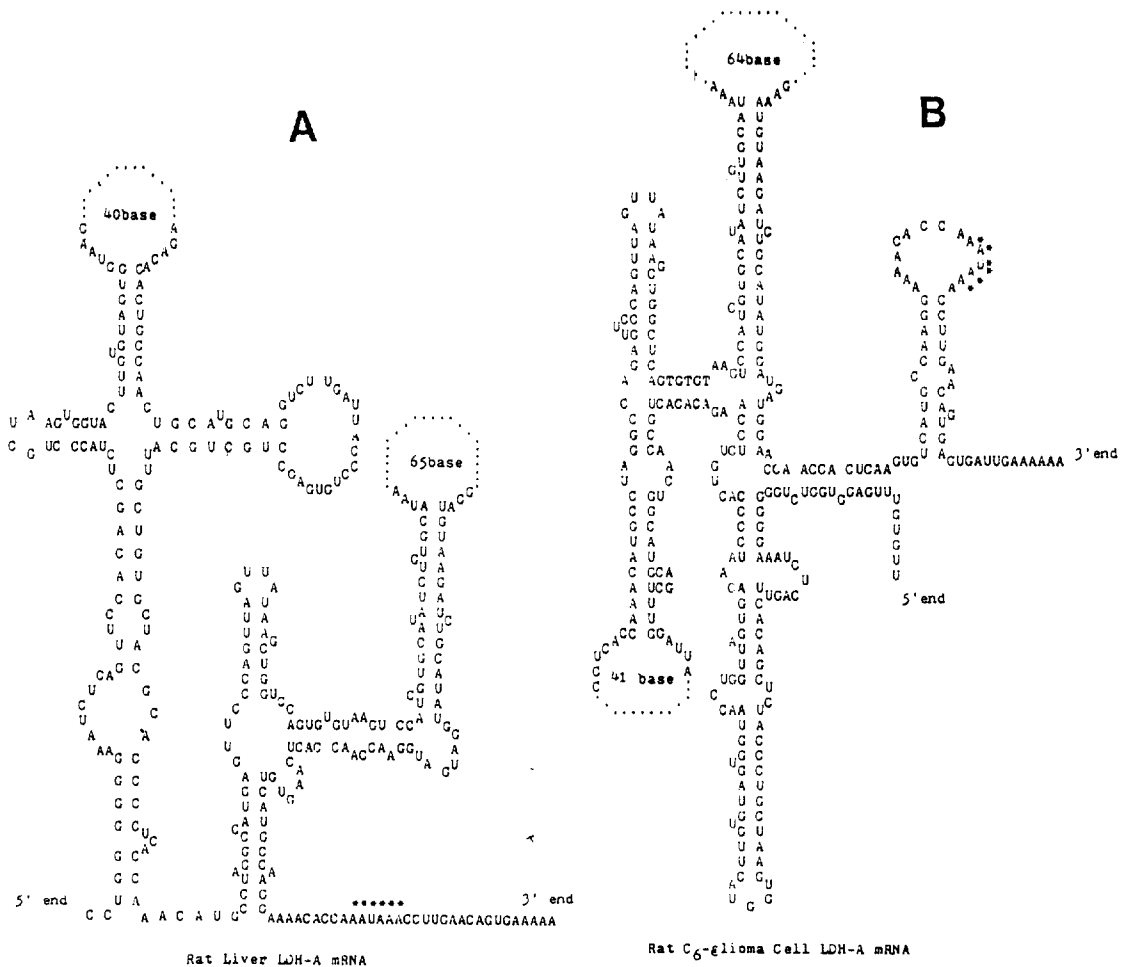


Fig. 7. Secondary Structures of LDH A-mRNAs Obtained from Rat Liver (A) and Isoproterenol Stimulated Rat C₆-glioma Cell Cultures (B).

The folding structures of LDH A-mRNAs were derived by using computer analysis with a program described by Zuker and Stiegler (1981).

mRNA의 반감기를 결정하는 정보는 그 mRNA의 분자내에 존재할 것으로 생각되며 (Caput, D., 1986; Simcox, A.A., 1985), 특정한 염기배열 순서에 함유된 정보에 따라 (Gray Show and Robert Kamen, 1986), 또는 어떤 특정한 2 차 구조를 형성함에 따라 (Ingrid, E. Bergmann, 1977) mRNA의 고유한 반감기를 갖게 될 것이라는 증거들이 제시되고 있다. mRNA의 비번역 부위는 RNase의 공격에 가장 민감한 부위이며 (Ingrid, E. Bergmann, 1980) 이 부위의 안정성이 곧 그 mRNA의 반감기를 결정할 것이라고 보고되고 있다 (Ross, J. *et al.*, 1986; Alexander von Gabain, 1983). 또한 mRNA의 3'-비번역 부위는 mRNA binding protein과 결합하여 RNase의 공격에 대하여 보호되며 이런 protein들의 RNA에 대한 binding affinity는 RNA의 2 차 구조에 의해 조절된다는 결과와 (Ingrid, E. Bergmann, 1977) 결부 시켜볼 때, 조직특이적으로 또는 홀몬자극에 의해 서로 상이한 2 차 구조를 갖는 두 LDH A-mRNA에 대한 RNA binding protein의 binding affinity는 서로 다를 것이라는 가능성을 시사하고 있다. Ingrid, E. Bergmann (1980)이 보고한 바에 의하면 mRNA의 번역효율은 nuclease에 의한 제한된 분해에 의하여 크게 감소하는데 반하여 *in vitro* translation product의 size에는 크게 영향을 미치지 않음이 관찰되었다. 또한 Ross 등 (1986)은 H₄ Histone mRNA의 3'-말단부위의 RNase에 의한 분해가 mRNA의 분해단계의 rate limiting step임을 보고한 바

있으며 β -lactamase, Omp A gene transcript의 경우에도 동일한 결과가 보고되고 있다 (Alexander von Gabain, 1986). 뿐만 아니라 beta, delta-globin mRNA의 경우는 3'-말단의 비번역 부위가 다른 염기배열을 가짐으로 각각 16.5시간과 4.5시간의 반감기를 갖게되며 (Pizarro, A., 1983), Yeast CYC 1-mRNA의 경우에 있어서 3'-말단의 비번역부위의 염기배열을 달리한 CYC 1 mRNA를 생산하므로 안정성이 달라진 것을 보고한 바 있다 (Zaret and Sherman, 1984).

이와같은 결과들로부터 3'-말단의 비번역부위의 염기배열순서는 RNase의 공격에 대한 조절정보를 갖고 있어서 mRNA의 고유한 안정성을 결정짓고 아울러 이들의 protein으로의 번역효율을 조절할 수 있는 기전을 갖고 있다고 예상할 수 있다. 따라서 본 연구결과에서 밝혀진 바와 같이 rat에서 분리된 glioma cell LDH A-mRNA와 liver LDH A-mRNA는 3'-말단의 비번역부위의 염기배열순서를 달리한 mRNA를 생산함으로써 조직특이적으로 다른 반감기를 갖게 될 뿐 아니라 이로인해 LDH A-mRNA의 번역효율을 조절하는 기전을 제안하고자 하며 아울러 Isoproterenol로 자극한 rat C₆ glioma cell LDH A-mRNA가 비교군의 C₆ glioma cell LDH A-mRNA에 비해 안정화된 이유의 하나는 LDH A-mRNA의 3'-말단 비번역 부위의 염기배열순서가 다르고 따라서 mRNA의 2 차 구조를 달리하므로 RNase에 대한 공격으로부터 안정화된 LDH A-mRNA를 생산하기 때문일 가능성도 아울러 제시하고자 한다.

적 요

Rat C₆ glioma cell에 있어서 LDH A subunit mRNA는 Isoproterenol 또는 dibutyryl cAMP로 처리한 후 그 분자농도가 약 2배 그리고 그 반감기는 약 3배가 증가된 LDH A-mRNA가 생성됨이 밝혀졌고 LDH A-subunit의 de novo 합성은 8-10배가 증가되었음이 관찰되었다. 또한 catecholamine 또는 dibutyryl cAMP 처리 후 rat C₆ glioma cell culture에서 반감기가 증가된 LDH A-mRNA의 생성기전이 LDH A-mRNA의 5'-말단 또는 3'-말단의 비번역 부위의 염기배열순서의 차이에 의한 것일 가능성이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 LDH A-mRNA의 안정성을 결정하는 염기배열순서를 검정할 목적으로 mRNA의 반감기를 결정하는 정보가 3'-말단의 비번역부위의 염기배열순서에 있다는 보고에 따라 일차적으로 isoproterenol로 자극한 rat C₆ glioma cell로부터 cloning하여 얻은 LDH A-cDNA와 rat liver λ gt 11-cDNA library로부터 plaque hybridization 방법에 의해 분리한 LDH A-cDNA의 3'-말단의 680 bp의 염기배열순서를 DNA sequencing에 의해 분석하고 computer analysis에 의한 두 mRNA의 secondary structure를 비교하였다. 염기배열순서의 분석결과에 의하면 C-말단의 59개 아미노산을 coding하는 염기배열순서는 동일하였으나 3'-비번역 부위에 있어서의 homology는 약 95%를 나타내었는데 특기할 사항은 3 부위의 염기배열순서는 5-9의 연속된 염기배열순서가 deletion 또는 insertion 된 것이 관찰

되었으며 이들 염기배열순서의 차이에 의한 secondary structure에는 큰 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과로 3'-말단 염기배열순서의 특이한 차이에 의해 동종의 rat의 liver와 glioma cell에서 생성된 LDH A-mRNA는 조직특이적으로 다른 2 차구조를 갖는, 따라서 이 두 조직에 존재하는 LDH A-mRNA는 다른 안정성을 갖을 가능성을 제시하며 아울러 rat glioma cell culture에서 Isoproterenol 처리 후 생성된 LDH A-mRNA의 반감기가 증가된 이유의 하나는 Isoproterenol로 처리하기 전후에 생성된 LDH A-mRNA의 3'-말단의 염기배열순서의 차이에 의해 다른 2 차 구조를 갖게되기 때문일 가능성을 제시하고자 한다.

사 사

본 연구는 부분적으로 과학재단 연구비와 문교부 학술연구 조성비에 의하여 수행되었다. 이들 연구비 보조에 대하여 심심한 감사를 하며 본 연구를 위해 컴퓨터 분석을 도와주신 Northwestern 의대 분자생물학과의 Jungmann 교수에게도 감사드리는 바이다.

REFERENCES

- Alexander von Gabain., J.G. Belasco., J.L. Schottel., A.C.Y. Chang., and S.N. Cohen, 1983. Decay of mRNA in Escherichia coli: Investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 653-657.
- Bergmann, I.E., and G. Brawerman, 1977. Control of Breakdown of the polyadenylate sequence in mammalian polyribosomes: Role of poly (adenylic acid)-Protein interactions. *Biochemistry*. **16**, 259-264.
- Bergmann, I.E., and G. Brawerman, 1980. Loss of the polyadenylate segment from mammalian mRNA. Selective cleavage of this sequence from polyribosomes. *J. Mol. Biol.* **139**, 439-454.
- Caput, D., B. Beutler., K. Hartog., R. Thayer., S. Brown-Shimer., and A. Cerami, 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 1670-1674.
- Chia, L.L., and C. Mclaughlin, 1979. Half-life of messenger RNA in Saccharomyces-Cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* **170**, 137-144.
- Derda, D.F., M.F. Miles., J.S. Schweppe., and R.A. Jungmann, 1980. Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase. Isoproterenol and N⁶,O²-dibutyryl cyclic AMP increase the level of lactate dehydrogenase-5 isozyme and its messenger RNA in rat C₆ glioma cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 11112-11121.
- Fuchs, R.P.P., F. Lacroute., and R. Losson, 1983. In vivo transcription of eukaryotic regulatory gene. *EMBO J.* **2**, 2179-2184.
- Jungmann, R.A., D.C. Kelley., and M.F. Miles, 1983. Cyclic AMP Regulation of Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258**, 5312-5318.
- Koch, H., and J.D. Friesen, 1979. Individual messenger RNA half-lives in Saccharomyces-Cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* **170**, 129-135.
- Kumar, S., J.F. McGinnis., and J. de Vellis, 1980. Coordinated modulation of albumin synthesis and mRNA levels in cultured hepatoma cells by hydrocortisone and cyclic AMP analogs. *J. Biol. chem.* **254**, 9379-9384.
- Leonard. G.D., M.D. Dibner., and J.F. Battey, 1986. Plasmid DNA preparation. cDNA cloning into gt 10 and gt 11. *Basic methods in molecular biology.* 129-216.
- Maniatis. T., E.F. Fritsch., and J. Sambrook, 1982. Transformation of Escherichia coli by plasmid DNA. *Molecular cloning.* 249-251.
- Markert, C.L., and E. Appella, 1961. Physicochemical mature of isozymes in multiple molecule forms of enzymes. *Ann. NY. Acad. Sci.* **94**, 678-690.
- Miles, M.F., P. Hung., and R. A. Jungmann, 1981. Cyclic AMP Regulation of Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chcm.* **256**, 12545-12552.
- Pizarro, A., and J. Ross, 1983. Human beta and delta globin messenger RNAs turn over

- at different rates. *J. Mol. Biol.* **167**, 607-617.
16. Ross, J., and G. Kobs, 1986. H₄ histone messenger RNA decay in cell-free extracts initiates at or near the 3' terminus and proceeds 3' to 5'. *J. Mol. Biol.* **188**, 579-593.
 17. Sanger, F., S. Nicklen., and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 18. Shaw, G., and R. Kamen, 1986. A conserved AU sequence from the 3'-untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* **46**, 659-667.
 19. Simcox, A.A., C.M. Cheney., E.P. Hoffman., and A. Shearn, 1985. A deletion of the 3'-end of the *Drosophila melanogaster* hsp 70 gene increase stability of mutant mRNA during recovery from heat shock. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3397-3402.
 20. Steven, S.L. Li., W.M. Fitch., Y.E. Pan., and F.S. Sharief, 1983. Evolutionary relationship of Vertebrate lactate dehydrogenase isozyme A₄ (Muscle), B₄ (Heart), and C₄ (Testis). *J. Biol. Chem.* **258**, 7029-7032.
 21. Zaret, K.S., F. Sherman, 1984. Mutationally altered 3'-end of yeast CYC 1 mRNA affect transcript stability and translational efficiency. *J. Mol. Biol.* **176**, 107-135.
 22. Zuker, M., and P. Stiegler, 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nuc. Acid. Res.* **9**, 133-148.

(Received May. 28, 1987)