

5'-Untranslated Region에 존재하는 Iron Responsive Element에 의한 Ferritin 합성조절

김해영^{1,3,*} · 정인식^{2,3} · 이종립^{1,3}

경희대학교 식품가공학과¹, 유전공학과² 및 유전공학 연구소³

초 록 : 철의 대사과정에 관여하는 ferritin 단백질의 발현은 ferritin transcript의 5'-untranslated region에 위치한 iron-responsive element (IRE)와 철 농도 조절 단백질의 결합에 의해 조절된다. 이러한 ferritin의 생성에 관여하는 구조적인 요소를 밝히기 위해, RNA 이차구조인 IRE의 bulge 부분을 다른 염기로 변환시켜 철 농도 조절단백질에 의한 RNA 결합력과 ferritin 단백질의 생성의 저해정도를 비교 측정하였다. 측정된 결과로부터 IRE의 bulge 부분의 시토신 염기배열만이 RNA 이차구조의 형성에 중요한 작용을 하여 ferritin 합성을 조절할 수 있는 것을 보였다. (1998년 5월 12일 접수, 1998년 6월 2일 수리)

서 론

모든 진핵생물의 철 대사 과정 중에 철 저장 단백질로 작용하는 ferritin은 heavy chain (M, 21,000)과 light chain (M, 19,000)으로 이루어진 24 개 subunits의 구형단백질이다.¹⁾ 이러한 ferritin 단백질의 생성에 5' untranslated region (5'-UTR)에 위치하는 IRE (Iron responsive element)라는 RNA의 이차 구조에 철 농도 조절 단백질인 iron regulatory protein (IRP)가 결합되어 ferritin의 생합성을 직접적으로 조절하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 6개의 염기로 이루어진 루프 구조, 5개의 수소 결합으로 이루어진 윗부분의 스템, 시토신의 bulge와 적어도 4개이상의 수소 결합으로 이루어진 아래부분의 스템 구조 등으로 구성된 RNA 이차 구조인 IRE³⁾와 IRP 단백질이 결합하여 ferritin 단백질 합성을 40배에서 100배까지 방해하여, 생합성을 저해시킨다는 보고가 있다.⁴⁾ 현재까지 보고된 유사한 mRNA의 5'-UTR에서 RNA와 단백질 결합에 의해 단백질 합성이 방해되는 유전자는 ferritin 이외에도 erythroid 5-aminolevulinic synthase, mitochondrial aconitase 같은 단백질이 이와 같은 기작으로 의해 단백질 합성이 조절되는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 이러한 3종류의 단백질들은 인체 내에서 철과 관련된 기작에 연관성이 있는 것으로 보고되었다. 5'-UTR에서의 보고된 다른 단백질 생성 저해 작용은 사람의 splicing factor U1A와 박테리오파지 MS2 coat protein, ribosomal protein, 초파리의 sperm tail protein 유전자 등으로 그들의 mRNA의 5'-UTR에 다른 염기 배열의 스템-루프 구조인 RNA에 의해 단백질 합성이 저해되는 보고가 있다.^{9,11)} 이와 같이 일반적으로 유전자에 대한 translation 과정에 직접적으로 관계되는 요소는 mRNA의 5'-UTR 구조로 알려져 있으며, 최근 Genbank¹²⁾ 등에 보고된 염기 서열들의 정보로부터, 다른 많은 mRNA 내

에서 ferritin의 5'-UTR의 IRE와 같은 유사한 RNA의 이차구조가 많은 유전자에 존재함을 알 수 있었다(unpublished result). 특히 이러한 ferritin 유전자의 IRE 구조의 중요성은 최근에 보고된 유전적으로 여러 세대에 걸쳐 혈액내 고농도의 ferritin이 측정되고 시각에 백내장 증세를 보이는 환자들로부터 ferritin의 IRE 구조에 변이가 발견됨으로써 부각되었다.^{13,14)} 그러나, 대부분 IRE 구조에 대한 연구는 IRE내의 loop인 CAGUGC 염기배열을 중심으로 보고되었다.^{4,15)} 그러므로 본 연구를 통하여 ferritin의 IRE에 존재하는 bulge 부분의 중요성을 살펴보기 위하여 bulge 부분을 변형시킨 후, 철 농도 조절 단백질과의 결합력과 ferritin 유전자의 생합성 정도를 측정하여 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

단백질 정량 및 분자량 측정

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 protein assay kit (Bio-rad, U.S.A.)를 사용하여 Bradford 방법에 따라 측정하였다.¹⁶⁾ 분자량은 SDS-PAGE상에서 protein molecular weight standards [myosin (200 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), β -lactoglobulin (18.4 kDa), lysozyme (14.3 kDa)](Gibco-BRL, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

철 농도 조절 단백질의 분리 및 농축

철 농도 조절 단백질의 분리 및 정제 방법은 baculovirus에서 과발현된 단백질을 FPLC (Pharmacia, Sweden)를 사용하여 기존에 보고된 조건으로 정제하였다.^{15,17)} 약 100 mg 정도의 baculovirus cytoplasmic lysate를 40 mM KCl, 25 mM Tris (pH 8.3), 및 1 mM DTT를 포함하는 완충용액에서 평

찾는말 : ferritin, iron-responsive element, 철 농도 조절 단백질
*연락처자

형 시킨 후, Mono-Q HR 컬럼이 부착된 FPLC를 이용하여 40~1000 mM 범위의 KCl 농도차이로 철 농도 조절 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 centricon 50 (Amicon, U.S.A.)을 이용하여 2 µg/µl 정도의 농도로 농축하여 -70°C에서 저장하여 사용하였다.¹⁸⁾

Plasmids 제조

Ferritin 유전자의 5'-UTR내 RNA의 이차구조인 35 개의 크기의 IRE 염기배열과 bulge 부분을 다른 3가지 염기배열로 변형시킨 IRE (Fig. 1)들을 RNA probe로 사용하기 위하여 T7 promoter 염기배열이 포함된 40개의 올리고뉴클레오티드를 합성하여 pUC19의 plasmid의 multiple cloning sites인 Pst I와 Hind III 위치에 subcloning 시켰다. 또한 *in vitro* translation에 사용될 ferritin의 유전자 부분이 포함된 벡터들은 pCL2³⁾를 template로 이용하여 bulge 부분을 올리고뉴클레오티드로 변형시켜 PCR로 합성하였다. 제조된 벡터들은 T7 primer와 sequenase (Amersham, U.S.A.)를 사용하여 염기배열 서열을 확인하였다.

RNA probe 제조

RNA probe로 사용될 ferritin의 IRE와 변형된 IRE는 *in vitro* transcription을 통해서 제조되었다. 4종류의 plasmid들은 Hind III를 이용하여 직선 형태로 만든 후, 각각 1 µg의 plasmid와 100 µCi의 [α -³²P]CTP (Amersham, U.S.A.) 방사성 동위원소와 각각의 2.5 mM의 ATP, GTP, UTP, 250 µM의 CTP, 2.5 mM의 DTT, 10 unit의 T7 RNA polymerase, DEPC로 처리된 물이 포함된 튜브 내에서 37°C의 온도에서 1시간 동안 반응이 수행되었다. 그리고 나서 0.5 M EDTA 1 µl와 formamide 26 µl를 반응이 끝난 튜브에 첨가한 후, 95°C에서 3분간 가열한 후, 얼음에 보관하였다.

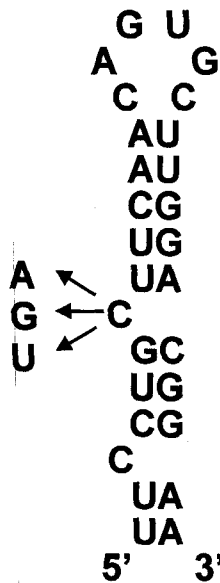


Fig. 1. RNA secondary structure of IRE containing mutations of bulge site. Arrows indicate mutation.

[³²P]로 방사선 표지가 된 RNA들은 polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행하여 생성된 RNA probe의 분리를 확인한 후, RNA 부위를 gel에서 잘라낸 다음, 새로운 튜브에 옮겨 55°C에서 8시간 동안 RNase-free 완충 용액을 사용하여 추출한다. 추출된 용액을 페놀과 클로로포름 혼합 용매로 추출하여, 불순물을 제거한 후, 냉각된 에탄올을 사용하여 RNA를 침전시켜, probe로서 사용하였다.

Gel-shift 분석

동위원소로 표지된 RNA probe는 철 농도 조절 단백질과 25°C에서 15 분간 반응시킨 후, 120 volt에서 2시간 동안 native polyacrylamide gel electrophoresis 통하여 단백질과 결합된 것과 결합되지 않은 probe를 분리하였다. 전기영동이 수행된 gel은 Whatman 용지에 옮겨 건조시킨 후, 단백질에 결합된 RNA probe의 [³²P] 양을 Image Quant 프로그램을 이용하여 PhosphorImager (Molecular dynamics, U.S.A.)로 측정하였다.

In vitro translation

Ferritin 유전자의 5'-UTR 내 IRE 염기배열의 bulge 부분이 변형된 3종류와 변형되지 않은 ferritin의 plasmid를 이용하여, *in vitro*에서 T7 RNA polymerase (Gibco-BRL, U.S.A.)를 이용하여 ferritin들의 transcript를 제조한 후, RNA의 전기영동을 통하여 생성된 RNA들의 크기를 확인하였다. 제조된 각 5 µg의 transcript들은 세포가 포함되지 않은 *in vitro* 조건하에서, 10 µCi의 [³⁵S]-methionine (Amersham, U.S.A.)과 methionine을 제외한 아미노산 혼합물, rabbit reticulocyte extract (Promega, U.S.A.), 철 농도 조절 단백질을 사용하여 30°C에서 1시간 반응시켜 생성된 ferritin 단백질의 정도를 SDS-PAGE에서 비교 측정하였다. 생성된 단백질 정도는 [³⁵S]-methionine으로 표지된 단백질 양을 PhosphorImager를 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

Ferritin mRNA의 IRE 구조의 변형 및 확인

mRNA의 5'-UTR에 RNA 이차구조는 단백질 합성의 조절작용에 큰 영향을 주는 것으로 알려졌다.²⁾ 이와 같은 RNA 구조가 단백질을 인식하는 곳에서의 translation에 영향을 미치는 mRNA의 이차구조와의 연관성을 조사하기 위해 사람의 ferritin 유전자의 IRE 부분이 포함된 35개의 염기로 구성된 RNA probe와 bulge 부분이 변형(Fig. 1)된 5'-UTR를 포함하는 전체 ferritin mRNA를 포함하는 변형된 3가지 종류의 벡터를 제조하였다. 이와 같이 변형시킨 유전자의 변형부위는 염기배열 분석법을 이용하여 올바른 염기배열의 변환을 확인한 후, T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription으로 RNA를 생성하였다.¹⁹⁾ 생성된 RNA는 formaldehyde-agarose gel를 이용하여 완전한 크기의 RNA가 형성되었음을 확인하였다.

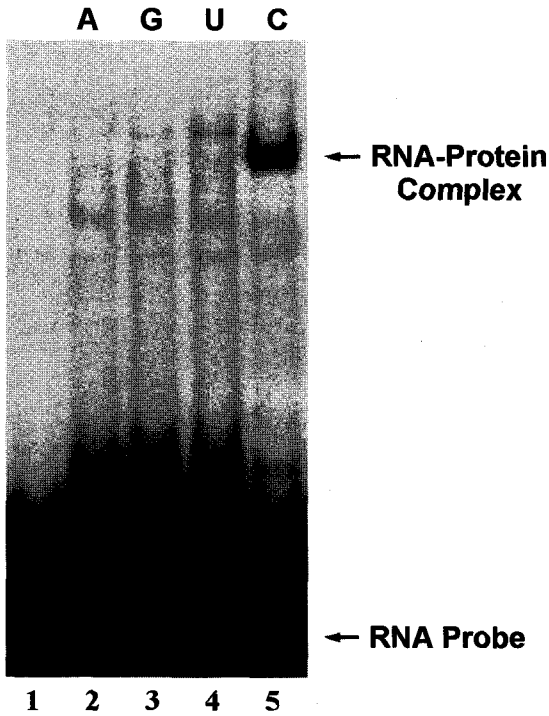


Fig. 2. Effects of mutation of IRE on band-shift activity.
A, G, or U indicates the mutation of adenine (lane 2), guanine (lane 3), or uracil (lane 4) residue from cytosine of IRE bulged position (lane 1 and 5) in the 5'-UTR of ferritin, respectively. Equal amounts of RNA probe (100 nM) were added to reactions containing 10 nM IRP (lane 2-5) or no IRP (lane 1)

RNA와 단백질의 결합력 측정

특이한 염기 배열의 ferritin내 5'-UTR에 위치하는 스템-루프의 RNA 이차 구조인 IRE에 결합하는 철 농도 조절 단백질의 특성을 살피고, 역가를 유지하는 정도를 확인하기 위하여 32개의 염기들로 이루어진 IRE와 변형된 염기 배열 등이 probe로 사용되었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 시토신에서 아데닌, 구아닌, 우라실로 bulge 부분이 변형된 IRE는 시토신에 비해 철 농도 조절 단백질과 결합된 복합체가 5%미만으로 철 농도 조절 단백질과 결합되지 않는 것이 PhosphorImager에 의해 정량되었다. 이러한 결과는 bulge에 위치한 시토신이 최근의 NMR 구조에서 밝혀진 IRE의 모델구조²⁰에서 루프의 염기배열과 수소결합으로 RNA의 이차구조를 유지하는데 bulge의 시토신이 중요 역할을 한다는 보고와 일치한다.

RNA 이차구조에 의한 단백질 생성의 조절

5'-UTR의 IRE의 bulge 부분이 변형된 각 ferritin의 transcript들을 사용하여 *in vitro* translation 실험으로부터 생성된 ferritin 단백질의 정도를 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 ferritin을 비교 측정하였다. 생성된 단백질은 21 kDa 크기의 단백질로 [³⁵S]-methionine으로 표지된 단백질 양을 PhosphorImager를 사용하여 측정된 값을 비교하였다. Fig. 3에서 비교된 바와 같이 5'-UTR에 정상적인 IRE 구조가 포함된 실험구는 철 농도 조절 단백질

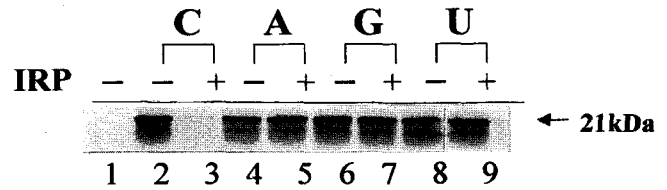


Fig. 3. Effects of mutation of IRE on *in vitro* translational repression.

A, G, or U indicates the mutation of adenine (lane 4-5), guanine (lane 6-7), or uracil (lane 8-9) residue from cytosine (lane 1-3) of IRE bulged position in the ferritin transcripts. Equal amounts of ferritin transcript (100 nM) except in lane 1 (no transcript) were added to reactions containing 10 nM IRP (lane 3, 5, 7, or 9) or no IRP (lane 1, 2, 4, 6, or 8)

이 ferritin의 IRE에 결합되어 ferritin 단백질의 생성이 저해 (lane 3)되었으나, bulge가 시토신 에서 아데닌, 구아닌, 우라실로 변형된 IRE를 포함하는 ferritin transcript에서는 철 농도 조절 단백질이 첨가되지 않은 대조구(lane 2, 4, 6, 8)와 같은 양으로 저해된 단백질 양에 비해 ferritin 단백질이 30배 정도 증가된 것이 측정되었다. 이러한 결과는 ferritin mRNA의 5'-UTR에 위치한 IRE의 RNA 이차구조에 철 농도 조절 단백질이 결합되어 ferritin의 생성에 영향을 준다는 기작²과 일치하며, 본 연구를 통하여 ferritin 유전자의 5'-UTR에 존재하는 IRE의 bulge 부분이 ferritin 단백질 합성에 중요 역할을 하는 것을 보였다. 또한 본 연구의 결과는 최근에 보고된 hyperferritinemia-cataract syndrome과 같은 철 대사과정에 관련된 유전병을 연구하는데 기초가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 실험은 1997년도 교육부 유전공학연구비 지급으로 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Hentze, M. W., Keim, S., Papadopoulos, P., O'Brien, S., Modi, W., Drydale, J., Leonard, W. J., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1989) Cloning, characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 7226-7230.
- Klausner, R. D., Rouault, T. A., and Harford, J. B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**, 19-28.
- Kim, H. Y., Klausner, R. D., and Rouault, T. A. (1995) Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by *in vitro* RNA binding for IRP1 and IRP2. *J. Biol. Chem.* **270**, 4983-4986.
- Haile, D. J., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1989) Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5055-5061.
- Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B., and Klausner,

- R. D. (1989) Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science* **244**, 357-359.
6. Gary, N. K. and Hentze, M. W. (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALS mRNAs. *EMBO J.* **13**, 3882-3891.
 7. Bhasker, C. R., Burgiel, G., Neupert, B., Emery-Goodman, A., Kuhn, L. C., and May, B. K. (1993) The putative iron-responsive element in the human erythroid 5-aminolevulinate synthase mRNA mediates translational control. *J. Biol. Chem.* **268**, 12699-12705.
 8. Kim, H. Y., Klausner, R. D., and Rouault, T. A. (1996) Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase. *J. Biol. Chem.* **271**, 24226-24230.
 9. Kaspar, R. L., Kakegawa, T., Cranston, H., Morris, D. R., and White, M. W. (1992) A regulatory cis element and a specific binding factor involved in the mitogenic control of murine ribosomal protein L32 translation. *J. Biol. Chem.* **267**, 508-514.
 10. Kempe, E., Muhs, B., and Schafer, M. (1993) Gene regulation in *Drosophila spermatogenesis*: analysis of protein binding at the translation control element TCE. *Dev. Genet.* **14**, 449-459.
 11. Stripecke, R., Oliveira, C. C., McCarthy, J. E. G., and Hentze, M. W. (1994) Proteins binding to 5' untranslated region sites: a general mechanism for translational regulation of mRNAs in human and yeast cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5898-5909.
 12. Benson, D., Lipman, D. J. and Ostell, J. (1993) GenBank database. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2963-2965.
 13. Beaumont, C., Leneuve, P., Devaux, I., Scoazec, J., Berthier, M., Loiseau, M., Grandchamp, B., and Bonneau, D. (1995) Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat. Genet.* **11**, 444-446.
 14. Martin, M. E., Fargion, S., Brissot, P., Pellat, B., and Beaumont C. (1998) A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* **91**, 319-323.
 15. Butt, J., Kim, H.Y., Basilion, J.P., Cohen, S., Iwai, K., Philpot, C. C., Altschul, S., Klausner, R. D., and Rouault, T. A. (1996) Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4345-4349.
 16. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248.
 17. Basilion, J. P., Kennedy, M. C., Beinert, H., Massinople, C. M., Klausner, R. D. and Rouault, T. A. (1994) Overexpression of iron-responsive element binding protein and its analytical characterization as the RNA-binding form, devoid of an iron-sulfur. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 517-522.
 18. Philpott, C. C., Haile, D. J., Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1993) Modification of a free Fe-S cluster cysteine residue in the active iron-responsive element-binding protein prevents RNA binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 17655-17658.
 19. Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA protein and aconitase. *Cell* **64**, 881-883.
 20. Address, K. J., Basilion, J. P., Klausner, R. D., Rouault, T. A., and Pardi, A. (1997) Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *J. Mol. Biol.* **274**, 72-83.

Regulation of Ferritin Synthesis by Iron-responsive Element in 5'-Untranslated Region

Hae-Yeong Kim^{1,3,*}, In-Sik Chung^{2,3}, and Jung-Lim Lee^{1,3} (¹Department of Food Science & Technology, ²Department of Genetic Engineering and ³Institute of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701 Korea)

Abstract : The expression of ferritin involved in iron metabolism is regulated at the translational level by the interaction of iron regulatory protein with iron-responsive element (IRE) in the 5'-untranslated region of ferritin transcript. To identify the role of structural element utilized for translational regulation of ferritin, we studied the effects of mutations in the ferritin IRE by measuring IRP binding activity and translational activity. Our data suggest that the cytosine at bulged position of IRE within ferritin is important for the formation of RNA secondary structure involved in translational regulation.

Key words : ferritin, iron-responsive element, iron regulatory protein

*Corresponding author