

Polyamine이 Spectinomycin에 의한 Group I Intron의 Splicing 억제에 미치는 영향

박인국*

동국대학교 응용생물학과

Cadaverine, putrescine, spermidine과 spermine이 spectinomycin에 의한 T4 파지 thymidylate synthase유전자 (*td*) intron의 splicing 억제에 미치는 영향을 조사하였다. Polyamine이 존재하지 않는 상태에서 7 mM spectinomycin은 splicing rate를 약 40% 감소시켰다. 사용한 농도 범위 (0.1-5 mM)에서 cadaverine은 splicing rate를 감소시켰으나, putrescine은 0.5 mM 농도에서 약 13% 정도의 splicing rate를 증가시켰다. Spermidine은 0.5 mM 농도에서 약 11% 정도의 splicing rate를 증가시켰으며, spermine은 0.01 mM 농도에서 약 16% 정도의 splicing rate를 증가시켰다. 시험한 polyamine 중에서 특히 spermine은 가장 낮은 농도에서 spectinomycin에 의한 억제반응을 극복하는 최고의 활성효과를 나타냈다. 이와 같은 억제 회복 효과는 polyamine에 의한 *td* intron 리보자임의 구조적 안정성에 기인하는 것으로 추정된다.

Key words □ polyamine, self-splicing, spectinomycin, T4 phage, *td* intron

T4 박테리오파지 티민 생합성 효소(thymidylate synthase)의 유전자(*td*)는 *Tetrahymena* rRNA 인트론(intron)처럼 self-splicing을 한다(2,4,13). Group 1 intron은 guanosine과 Mg²⁺ 존재하에서 스스로 자신의 RNA를 절단 및 연결하는 리보자임이다. Group 1 intron의 self-splicing을 억제하는 여러 종류의 물질들이 알려져 있다. 예로서 deoxyguanosine과 dideoxyguanosine(1), arginine(17), streptomycin(14), viomycin(16) 등은 경쟁적 억제 물질로서 guanidino group를 공통적으로 보유하고 있다. 그러나 aminoglycoside계의 항생제인 neomycin, gentamicin, kanamycin과 tobramycin 등은 비경쟁적 억제물질로 작용한다(16). 최근 neomycin이 *td* intron RNA의 stem P4와 P5 사이에 위치한 loop과 guanosine-binding site에 인접한 촉매 부위에 결합하므로써 억제 현상이 일어남이 밝혀졌다(9).

Polyamine은 세포 분열 및 분화 그리고 세포 생장에 중요한 작용을 한다(15). 뿐만아니라 DNA, RNA 그리고 단백질 합성에 영향을 미쳐 세포내 전반적인 대사활동을 조절하고 있다. 인간 HDV(hepatitis delta virus)의 리보자임(ribozyme)의 경우 spermidine 존재하에서 hammerhead ribozyme의 self-splicing을 촉진시키는데, 이는 ribozyme의 인산기 사이의 전하 반발(charge repulsion)을 감소시키기 때문인 것으로 알려지고 있다(12). 이러한 현상은 특히 낮은 농도의 2가 양이온에서 현저하게 나타났으며, spermidine이 RNA 구조를 활성화시켜 촉매 작용에 필요한 적절한 folding을 촉진하는 것으로 보고되었다. Hairpin ribozyme에서는 spermidine이 splicing에 필요한 Mg²⁺

의 농도를 감소시키고, 특히 Mn²⁺의 경우 약 100배 정도 splicing 촉매 반응을 촉진시키는 것으로 나타났다(3). 그러나 Co²⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Li⁺ 및 Rb⁺ 등의 경우에는 아무런 영향을 주지 않았다. Hammerhead RNA의 경우 spermine을 첨가했을 때 Zn²⁺, Cd²⁺과 Sr²⁺ 이온 등에 의한 splicing 반응은 현저히 촉진되었으나 Ca²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺ 등에서는 아무런 영향을 주지 않았다(6). Spermine의 효과는 양이온의 반지름 크기와 관련되는 것으로 보고되었다.

Spectinomycin은 *Streptomyces spectabilis*로부터 생성되는 aminoglycoside 항생제로서, 30S ribosome에 결합하여 단백질 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다(11). 또한 이 항생제는 단백질 합성 과정에서 개시 복합체(initiation complex)의 형성을 억제하여 단백질 합성을 억제하기도 한다(10). 그 이외에 개시 인자(initiation factor)도 영향을 받게된다. Spectinomycin은 살균제가 아니라 세균 발육 저해제(bacteriostatic agent)라는 점에서 streptomycin과 다른 aminoglycoside 항생제와는 구별된다(7). Group I intron의 splicing에 대한 spectinomycin과 polyamine의 상호작용에 관한 연구 보고는 아직 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 polyamine이 spectinomycin에 의한 splicing 억제에 미치는 영향을 조사하는 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 *Escherichia coli* TG1과 HBO1 균주는 Amersham에서 구입하였다. M13mp8 phage는 Bethesda Research Laboratory에서, pGEM2는 Promega corp.에서 구입

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 02-2260-3320, Fax: 02-2269-4560
E-mail: ikpark@dgu.ac.kr

하였다.

시료

*EcoR*I과 *Hind*III 제한효소는 New England Biolabs에서, T7 RNA polymerase는 US Biochemical Co.에서, RNasin과 RQ1 DNase는 Promega Corp.에서 구입하였다. [α -³²P]GTP와 nucleoside triphosphate는 Amersham에서 구입하였다

재조합 플라스미드

pGEM 재조합 플라스미드는 *E. coli* HB101세포에 transformation시킨 다음 ampicillin과 chloramphenicol을 사용하여 증폭시켰다. pGEM 재조합 플라스미드는 390 nt의 5'exon 1, 1016 nt의 intron과 824 nt의 3'exon 2로 구성되어있다. *td* fragment의 promoter alignment는 0.8% agarose gel로 확인하였다.

In vitro RNA 합성

pGEM 재조합 플라스미드에 클론된 *td* fragment내 exon 2로부터 520 bp 아래 위치한 부분을 *Hpa*I으로 자른후, phenol 추출과 ethanol 침전을 통해 template을 준비하였다. 전사는 전사 완충액(40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 5 mM NaCl), 10 mM DDT, 1 U/ml RNasin, 0.5 mM의 각 rNTP, 5 μ Ci의 [α -³²P]GTP, 10 U의 T7 RNA polymerase 존재하에서 30°C에서 4 분간 실시하였다. 전사 후 2.23 kb의 primary transcript는 Nensorb cartridge(Dupont)을 사용하여 정제하였다.

In vitro self-splicing 반응

다양한 농도의 polyamine (0.5~10 mM)을 spectinomycin이 포함된 splicing buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂)에 넣어 10 분간 incubation 하고, 100 μ M GTP를 첨가하여 58°C에서 10 분간 반응 시킨다. 그 다음 stop solution (95% formamide, 20 mM Na₂EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 첨가하여 반응을 정지시킨다. RNA sample을 4% polyacrylamide 8 M urea gel에 loading 하고 20 mA에서 3 시간 전기영동 한다. 전기 영동이 끝난 gel을 X-ray film에 노출시킨 후 현상한다. 그리고 Hoefer Image Analyzer를 이용하여 각각의 splicing product과 splicing 되지 않은 pre-RNA의 gel density를 면적으로 환산하여 총 면적으로 계산한다. 이 총 면적에 대하여 E1-E2 ligation에 해당되는 면적의 상대적 비율을 %로 표시한 수치가 relative splicing rate(%)가된다.

결과 및 고찰

Group 1 intron RNA는 여러 종류의 작은 분자들에 의해 splicing이 억제된다. 그 대표적인 예로서 aminoglycoside 계통과 nonaminoglycoside 계통의 항생제가 있다. Aminoglycoside 계통의 항생제인 neomycin, gentamicin, kanamycin, tobramycin 등은 모두 group I intron RNA의 self-splicing에 비경쟁적 억제

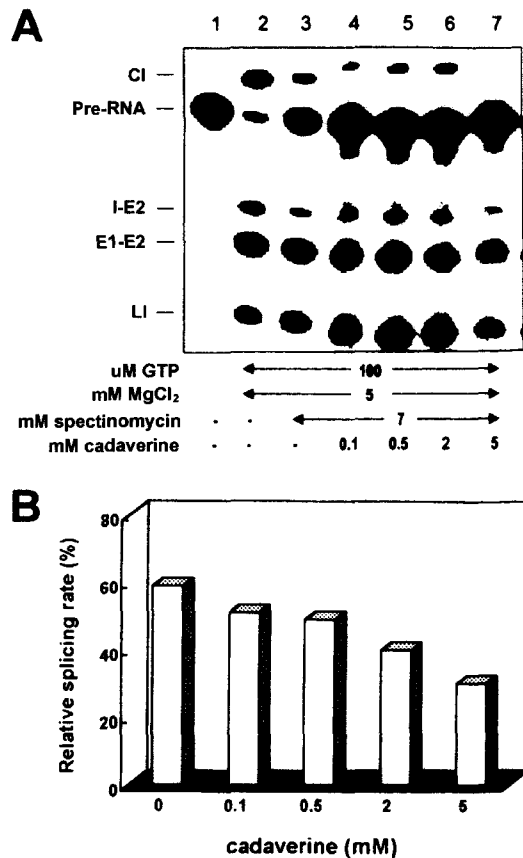


Fig. 1. Effect of cadaverine on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by spectinomycin. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of cadaverine (0.1-5 mM) on self-splicing in the presence of 7 mM spectinomycin. Lane 1, unspliced pre-RNA; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of cadaverine. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

현상을 나타낸다(14,16). Spectinomycin도 aminoglycoside 항생제의 일종이며 본 실험실에서 연구한 결과 다른 aminoglycoside 항생제들처럼 혼성 비경쟁적 억제반응을 나타냈다(미발표 data).

본 실험에서 spectinomycin에 의한 splicing 억제 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 cadaverine, putrescine, spermine, spermidine 등을 사용하였다. Spectinomycin과 cadaverine이 없는 상태에서 정상적인 splicing 즉 circular intron, intron-exon 2, exon 1-exon 2, linear intron등의 splicing product가 일어났다(Fig. 1A). 그러나 7 mM spectinomycin 존재하에서 splicing activity는 정상적인 splicing activity에 비해 약 40% 감소하였다(Fig. 1B). 만약 cadaverine를 낮은 농도 (0.1 mM)로 부터 높은 농도 (5 mM)에 걸쳐 증가시켰을 때 splicing activity는 오히려 감소하는 경향을 나타냈다.

Spectinomycin이 존재하지 않는 상태에서 splicing은 정상적인 활성을 나타내었다(Fig. 2A. lane 2). 그러나 7 mM spectino-

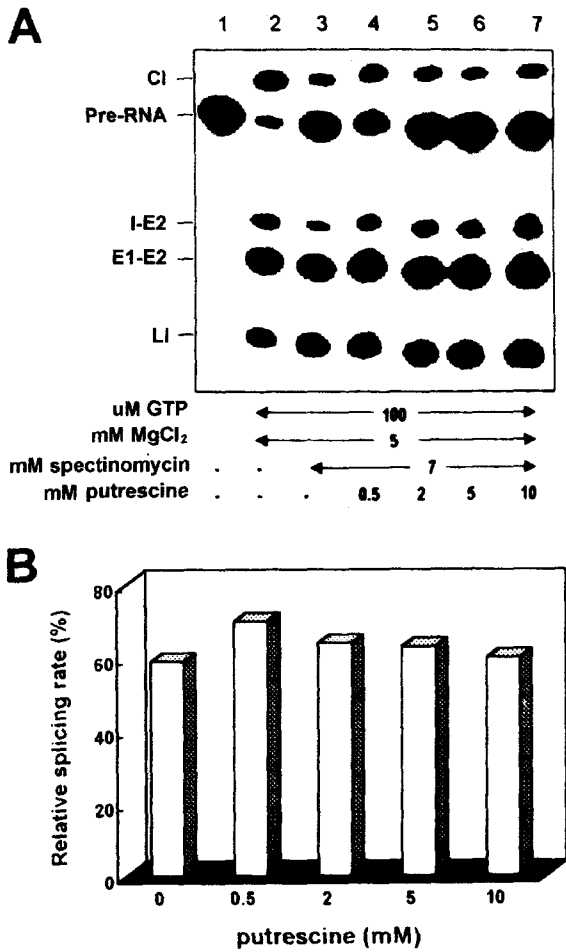


Fig. 2. Effect of putrescine on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by spectinomycin. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of putrescine (0.5-10 mM) on self-splicing in the presence of 7 mM spectinomycin. Lane 1, unspliced pre-RNA; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of putrescine. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

mycin 존재하에서는 splicing activity가 약 40% 정도 감소하였다 (Fig. 2A, lane 3). Putrescine을 첨가하였을 경우 0.5 mM 농도에서 약 13% 정도의 splicing율이 증가하였다(Fig. 2B). 그러나 putrescine 농도를 2 mM로부터 10 mM로 증가시켰을 때 splicing activity는 큰 영향을 받지 않았다.

Spermidine의 경우도 putrescine처럼 0.5 mM 농도에서 가장 높은 약 11%의 splicing율을 나타내었다. 그리고 1 mM spermidine에서부터 splicing activity가 서서히 감소하는 경향을 보였다. 흥미롭게도 5 mM 농도에서는 spermidine이 전혀 없는 경우에 비해 오히려 약 10% splicing율이 감소하였다.

Spermine의 경우는 0.01 mM 농도에서 약 16% 정도의 splicing율이 증가하였으나 0.05 mM 농도에서 부터 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 0.5 mM 농도에서는 오히려

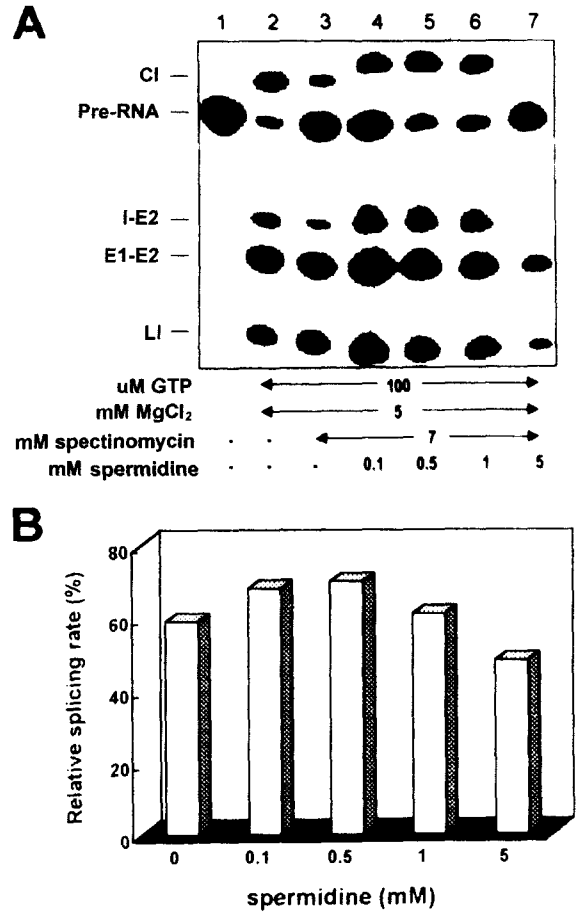


Fig. 3. Effect of spermidine on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by spectinomycin. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of spermidine (0.1-5 mM) on self-splicing in the presence of 7 mM spectinomycin. Lane 1, unspliced pre-RNA; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of spermidine. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

spermine이 없을 때 보다 훨씬 더 감소하였다.

시험한 polyamine중에서 spermine이 spectinomycin에 의한 splicing 억제반응을 가장 낮은 농도(0.01 mM)에서 효율적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 spermine과 spermidine의 경우에는 보유하고 있는 양전하(positive charge)의 숫자와 비례하는 것처럼 보이지만, 두 개의 양전하를 갖고있는 putrescine과 cadaverine의 경우에는 적용되지 않는 것으로 나타났다. 그 이유는 현재 알 수 없으나 양전하 이외에 다른 구조적 성분이 관여하는 것으로 추정된다.

Human delta virus의 경우 spermine(0.5 mM)은 낮은 농도의 Mg²⁺에서 리보자임의 인산기를 중화하여 그 구조를 안정화시키는 것으로 나타났다(12). Spermine에 의한 리보자임의 적절한 folding은 splicing 촉매반응에 필수적이다. 이와 매우 유사한 결과가 Dahm과 Uhlenbeck에 의해 hammerhead RNA의 splicing

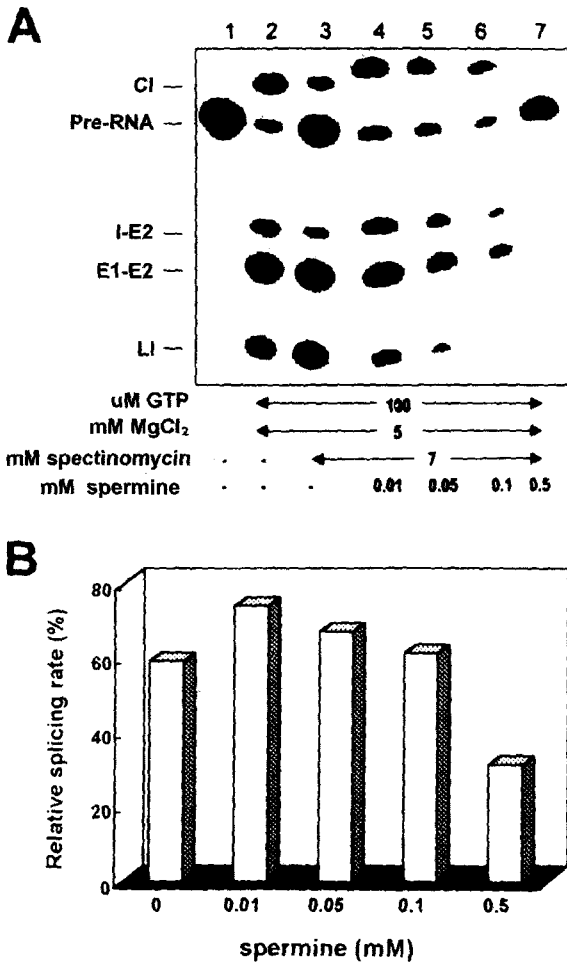


Fig. 4. Effect of spermine on the self-splicing inhibition of *td* intron RNA by spectinomycin. A. Autoradiogram showing the effect of varying concentrations of spermine (0.01-0.5 mM) on self-splicing in the presence of 7 mM spectinomycin. Lane 1, unspliced pre-RNA; I-E2, intron-exon 2; E1-E2, exon 1-exon 2 ligation product; LI, linear intron. B. Splicing rates of the intron RNA as a function of concentrations of spermine. The ratio of E1-E2 ligation produced in each splicing reaction to that of the normal splicing reaction was expressed as relative splicing activity.

반응에서 보고되었는데, spermine은 첨가된 금속이온이 없는 상태에서 splicing을 촉진시키는 것으로 나타났다(6).

최근 Hammann과 Tabler는 spermidine이 ribozyme과 RNA substrate가 결합하여 복합체를 형성하는 과정에서 그 구조에 현저한 영향을 미친다는 실험 결과를 보고 하였다(8). Spermidine의 존재하에서 활성화된 구조의 리보자임-RNA substrate 복합체의 형성이 결국 splicing반응을 촉진시키는 결과를 초래한다는 것이다. *Neurospora VS* 리보자임의 splicing의 경우에도 spermidine은 리보자임 구조의 folding을 안정화 시킴으로써 splicing 반응을 활성화시키는 것으로 나타났다(5).

상기한 여러종류의 리보자임에 관한 연구결과에서 연구자들이 실제 polyamine에 의한 리보자임 folding의 안정화를 아직 실험적으로 규명하지는 못하였다. 그러나 이들 연구자들은 spermine

과 spermidine이 리보자임의 인산기의 음전하를 중화시키므로써, 리보자임이 안정화된 folding을 형성하도록 하는 과정을 도모하는 것으로 추정하였다. 그리고 이와같은 활성화 작용은 결국 리보자임의 splicing 촉매반응을 증가시키는 것으로 나타났다고 설명하였다.

결론적으로 본 연구에서도 spermine과 spermidine은 상기한 연구결과와 매우 유사하게 splicing 반응을 활성화시켰으며, 특기할 사항은 spectinomycin에 의한 RNA splicing 억제를 spermine이 효율적으로 감소시키는 효과를 나타낸다는 사실이다. 다른 리보자임의 경우처럼 spermine은 *td* intron RNA의 구조적 안정화를 도모하여 활성을 촉진하는 것으로 생각된다. Spermine이 어떤 기작으로 spectinomycin에 의한 splicing 억제를 완화시키는가를 이해하려면 앞으로 footprinting 분석을 통해 그 상호관계를 규명할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 말

본 연구는 1999년도 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌습니다.

참고문헌

- Bass, B. and T. R. Cech. 1996. Ribozyme inhibitors : deoxyguanosine and dideoxyguanosine are competitive inhibitors of self-splicing for the Tetrahymena ribosomal ribonucleic acid precursor. *Biochemistry* **25**, 4473-4477.
- Cech, T. R., N. K. Tanner, I. Tinoco, Jr., B. R. Wein, M. Zuker, and P. S. Perlman. 1983. Secondary structure of the Tetrahymena ribosomal RNA intervening sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 3903-3907.
- Chowrira, B. M., A. Berzal-Hersanz, and J. M. Burke. 1993. Ionic requirements for RNA binding, cleavage, and ligation by the hairpin ribozyme. *Biochemistry* **32**, 1088-1095.
- Chu, F. K., G. F. Maley, F. Maley, and M. Belfort. 1984. Intervening sequence in the thymidylate synthase gene of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3049-3053.
- Collins, R. A. and J. E. Olive. 1993. Reaction conditions and kinetics of self-cleavage of a ribozyme derived from *Neurospora VS* RNA. *Biochemistry* **32**, 2795-2799.
- Dahm, S. C. and O. C. Uhlenbeck. 1991. Role of metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* **30**, 9464-946.
- Davies, J., P. Anderson, and B. D. Davies. 1965. Inhibition of protein synthesis by spectinomycin. *Science* **149**, 1096-1098.
- Hammann, C., R. Hormes, G. Sczakiel, and M. Tabler. 1997. A spermidine-induced conformational change of long-armed hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4715-4722.
- Hoch, I., O. Berenes, E. Westhof, and R. Schroeder. 1998. Antibiotic inhibition of RNA catalysis: Neomycin B binds to the catalytic core of the *td* group 1 intron displacing essential metal ions. *J. Mol. Biol.* **282**, 557-569.
- Reosser, F. 1976. Effect of spectinomycin on peptide chain initiation. *J. Antibiotic.* **29**, 1328-1333.
- Sammes, P. G. 1979. Topics in Antibiotic Chemistry, vol., P.24, Susses, England.

12. Suh, Y. A., P. K. R. Kumar, K. Taira, and S. Nishikawa. 1993. Self-cleavage of the genomic HDV ribozyme in the presence of variant divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3277-3280.
13. Sung, J. S. and I. K. Park. 1996. Effect of K⁺ ion on *in vitro* RNA splicing of T4 phage thymidylate synthase gene. *J. Microbiol.* **34**, 49-53.
14. Von Ahsen, U. and R. Schroeder. 1991. Streptomycin inhibits splicing of group I intron by competition with guanosine substrate. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2261-2265.
15. Tabor, C. W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.
16. Wank, H., J. Rogers, J. Davies, and R. Schroeder. 1994. Peptide antibiotics of the tuberactinomycin family as inhibitors of group I intron RNA splicing. *J. Mol. Biol.* **236**, 1001-1010.
17. Yarus, M. 1988. A specific amino acid binding site composed of RNA. *Science* **240**, 1751-1758.

(Received November 18, 1999/Accepted December 15, 1999)

ABSTRACT : Effects of Polyamine on the Self-splicing Inhibition of Group I Intron by Spectinomycin

In Kook Park*(Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea)

Effects of polyamines such as cadaverine, putrescine, spermidine and spermine on the self-splicing inhibition of the T4 phage thymidylate synthase(*td*) intron by spectinomycin have been investigated. Without polyamine 7 mM spectinomycin caused 40% reduction of the splicing rate. Cadaverine reduced the splicing rate over the concentrations of 0.1 to 5 mM. Putrescine at 0.5 mM increased the splicing rate by 13%. Spermidine at 0.5 mM enhanced the splicing rate by 11% while spermine at 0.01 mM enhanced the splicing rate by 16%. Of the all polyamines tested, spermine exhibited the maximum activation effect to counteract the splicing inhibition by spectinomycin. This effect appears to be due to the role of polyamine in stabilizing the conformation of *td* intron ribozyme essential for the catalytic function.