

단백질합성인자 eIF5B의 저 발현 효모벡터의 제조 및 특성

최상기^{1*} · 송진희¹ · 이준행² · 이병욱³ · 성치남¹

¹순천대학교 생물학과, ²연세대학교 의과대학 안과, ³고신대학교 생명과학부

eIF5B는 단백질합성의 개시인자로서 Met-tRNA^{Met}을 AUG 개시코돈에 전달하고, 리보솜의 두 소단위체 결합을 유도한다. 이 인자의 기능을 연구할 목적으로 eIF5B를 코딩하는 *FUN12* 유전자의 5'말단 부위를 삭제하는 연구를 수행하였다. 프로모터의 대부분을 삭제한 *FUN12*를 함유한 pRS 효모벡터를 *FUN12*가 삭제되어 천천히 자라는 돌연변이주 (*fun12Δ*)에 전달하였을 때 그 표현형을 부분적으로 상보하였다. 위와 같이 제조된 벡터에서 N-말단이 상실된 eIF5B 단백질이 발현되었고, 그 양이 정상 균주에서 발현되는 eIF5B 양의 약 5%에 불과하였다. 이와 같이 부분적으로 성장을 상보한 균주에서 발현된 적은 양의 단백질합성개시 인자 eIF5B는 직접적으로 그 성장을 제한하는 요소로 작용한다. 이러한 균주에서 성장의 제한인자인 eIF5B는 *in vitro* 에서도 역시 전체 단백질합성의 활성을 조절하였다.

Key words □ eIF5B, factor, *FUN12*, translation

유전자발현 중 보편적으로 잘 보존된 과정이 단백질합성 중 AUG 개시코돈에 Met-tRNA^{Met}을 전달하는 개시단계이다. 원핵생물에서는 약 90kDa의 한 개의 폴리펩티드인 단백질합성인자인 IF2이며 진핵생물에서는 세 개의 서로 다른 소단위로 구성된 eIF2가 Met-tRNA^{Met}을 리보솜에 전달하는 과정을 담당한다(7). 따라서 세균의 IF2가 효모와 원시세균에서 발견된 것은 매우 흥미롭다. 효모에서의 IF2 유사유전자는 *FUN12*에 의해 코딩되는데 이 유전자가 삭제된 *Saccharomyces cerevisiae*는 매우 천천히 자라는 표현형을 나타내며 폴리리보솜 분석에 의하면 단백질합성의 개시단계에서 결함이 나타났다는(2, 6). 이러한 단백질합성의 결함은 *FUN12*가 삭제된 균주에서 제조된 추출액에서 명백하게 나타났으며, 이러한 결함이 재조합 된 효모 IF2 단백질을 그 추출액에 다시 첨가하였을 때 첨가된 양에 비례하여 회복되었다. 이러한 결과는 효모 IF2가 일반적인 단백질합성인자임을 보여준다(2). 인간 및 원시세균의 IF 유사유전자가 EST database에서 발견되었으며, 이들 단백질인자가 기능적으로 효모의 단백질을 대신할 수 있음이 *in vivo* 및 *in vitro* 상에서 증명되었다(10). 따라서 IF2는 진핵적 측면에서 보편적으로 잘 보존된 단백질합성 개시인자임을 보여주는 것이다. 최근의 생화학적인 분석에 의해 eIF5B로 명명된 진핵생물의 IF2 유사유전자가 단백질합성의 개시단계에서 리보솜의 소단위체 결합에 필수적으로 요구되며, 60S 리보솜에 의존적인 GTP 가수분해활성을 갖고 있다는 것이 밝혀졌다(15). 또한 효모의 two-hybrid 분석, 상호 면역학적 침전반응, *in vitro* 결합반응과 유전학적 분석에 의해 세균에서 발견되는 단백질합성인자인 IF1의 진핵생물 유사유전자인 eIF1A가 물리적 및

기능적으로 eIF5B와 상호 접촉이 입증되었다(3). 이러한 결과로부터 eIF1A와 eIF5B는 리보솜의 A 자리에 위치하여 P 자리에 위치하는 Met-tRNA^{Met}의 적절한 결합을 안정화시킨다는 것을 보여준다. 따라서 세균에서의 단백질합성인자인 IF2와 IF1은 진핵생물에서도 잘 보존되어 있으며 상호 협력하여 단백질합성을 증진시키는 작용을 한다. 이러한 연구는 진핵생물과 원핵생물의 IF2 단백질 기능의 유사성 및 차이점을 보여준다(5).

본 연구에서는 eIF5B의 기능을 연구할 목적으로 이 유전자의 돌연변이를 유발하였다. 이 인자 기능이 저하된 돌연변이 유전자를 효모에서 선별하였다. 이 돌연변이 유전자를 함유한 효모벡터는 프로모터를 포함한 5'부위가 상실되었으며, 변이가 일어난 인자의 발현이 저하되었다. 단백질합성인자의 저 발현은 *Saccharomyces cerevisiae*의 성장을 제한하였으며, *in vitro*에서도 역시 적은 양의 인자는 단백질합성의 제한요소이었다.

재료 및 방법

FUN12 plasmid의 제조

FUN12 유전자를 포함하는 3.55kb *NspV* DNA단편을 λ clone PM-5080 (70512, ATCC, Rockville, MD)에서 분리하여 효모의 high-copy-number plasmid인 pRS426의 *Clat* 부위에 삽입시켜 짧은 길이의 *FUN12* 유전자를 제조하여 short length (SL) *FUN12*로 명하였다(4)(Fig. 1). 전장 (full-length: FL)의 *FUN12* 유전자를 만들기 위하여 *Eco47III*의 전장 1.5kb에 *SalI*염기서열이 부가된 프라이머를 제조하여 λ clone PM-5080을 template로 사용하여 PCR 증폭하였다. 만들어진 1.56kb *SalI/Eco47III* DNA단편을 SL *FUN12*의 약 1.13kb *SalI/Eco47III* DNA와 교체하여 결과적으로 SL *FUN12*의 5'에 432bp의 DNA를 확장하여 이를 *FUN12* (FL)라 명하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 061-750-3619, Fax: 061-750-3608
E-mail: sangkic@sunchon.ac.kr

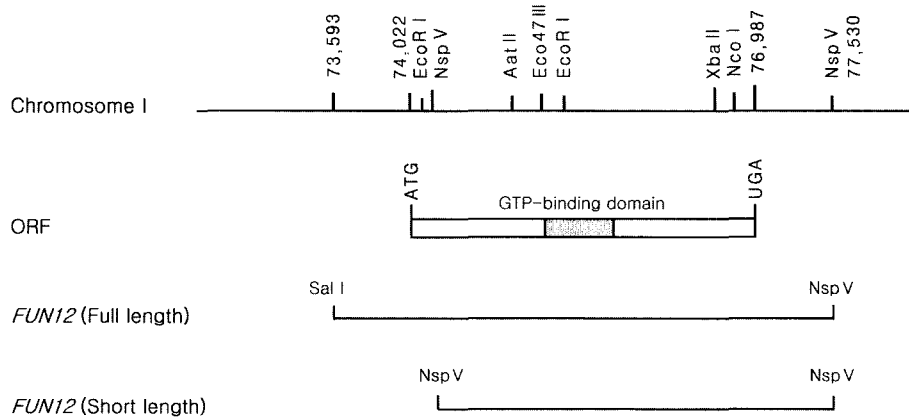


Fig. 1. Partial restriction map of chromosome I near *FUN12* and construction of eIF5B lacking 5' end of its sequence. Shown are the full-length (FL) form and N-terminally truncated short-length form (SL) of yeast eIF5B. *FUN12* coding region corresponds to 3.0-kb eIF5B ORF (boxed) and contains the 0.5-kb GTP-binding domain (shaded). Numbers on the chromosome I denote nucleotide sequences; AUG, start codon; UGA, termination codon.

In vitro 단백질 합성 분석

단백질 합성 추출액은 Choi 등(2)이 기술한 방법에 따라 제조하여 액체질소에 보관하였다. 5'에 capping되고 3'에 poly(A)를 갖는 luciferase mRNA는 T7 promoter하에서 T7 전사합성 kit를 이용해 제조하였다. 단백질 합성 반응은 Choi 등(2)이 기술한 방법에 따라 행하였으며, 인광은 10 µl의 단백질 합성 추출액에 100 µl의 인광 반응 기질을 넣고 인광 측정기 (Turner TD-20e luminometer)로 측정하였다.

Western blotting

여러 균주에서 얻어진 균추출액은 정확히 15 µg을 각각 SDS-PAGE로 적하 후 분리하였고 이동된 단백질을 nitrocellulose 막에 전기적으로 이동시켰다. eIF5B는 GST-eIF5B에 대해 만들어진 항혈청으로 위의 막을 탐지 관찰하였다 (2).

결 과

eIF5B의 부분적인 기능을 갖는 유전자의 제조

eIF5B를 코딩하는 *FUN12* 유전자가 삭제된 균주 (*fun12Δ*)는 매우 천천히 자라는 표현형을 보였다(2). 이러한 *fun12Δ* 균주에 전장의 *FUN12* 유전자를 발현하면 이러한 표현형을 완전히 상보하여 정상적인 성장을 하였다(Fig. 2). Fig. 1에서와 같이 제조된 짧은 길이의 *FUN12*(SL *FUN12*)를 low copy (l.c.)수의 plasmid인 pRS316에서 발현시킨 경우 *fun12Δ*균주의 표현형을 부분적으로 상보하였다 (4). 역시 위와 같이 제조된 *FUN12*를 high copy (h.c.)수의 plasmid인 pRS426에서 발현시켰을 때는 전장의 *FUN12*가 발현되는 균주와 유사하게 성장이 증가되었다. 이러한 결과는 짧은 길이의 *FUN12* 유전자를 포함한 벡터에서 기능이 현저히 저하된 eIF5B가 발현됨을 보여준다.

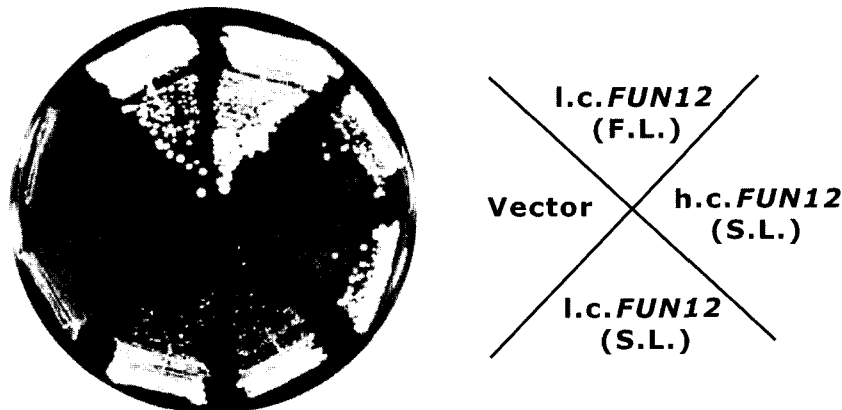


Fig. 2. Partial complementation of slow-growth phenotype of *fun12Δ* strain by low expression of truncated *FUN12*. The various eIF5B proteins were expressed under the control of native *FUN12* promoter on low-copy-number (l.c.) or high-copy-number (h.c.) plasmids in *fun12Δ* strain and tested for the ability to complement the slow-growth phenotype of the strain.

발현된 eIF5B의 Western blotting에 의한 조사

Fig. 2에서와 같이 부분적으로 *FUN12* 유전자를 상보한 새롭게 제조된 짧은 길이의 유전자의 특성을 알기 위해서 발현된 eIF5B를 Western blotting으로 조사하였다. 여러 균주들을 배양한 후 이들의 균 추출액을 SDS-PAGE로 분리한 후에 immunoblotting을 이용하여 *FUN12*의 발현을 분석하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 짧은 길이의 *FUN12*를 함유한 *fun12Δ* 균주는 정상균주보다 크기가 작은 eIF5B가 발현되었다 (lane 1, 2). 이러한 작은 크기의 eIF5B는 N-말단 부위가 상실되었을 것으로 사료된다. 전장 eIF5B의 약 1/3을 차지하는 N-말단 부위는 eIF5B의 기능에 영향을 없는 것으로 밝혀졌기 때문에 이렇게 발현된 짧은 길이의 eIF5B는 정상적인 기능을 할 것으로 사료된다(3). 흥미롭게도 *fun12Δ* 균주의 표현형을 부분적으로 상보한 짧은 길이의 *FUN12*를 함유한 low-copy 수의 plasmid를 포함한 균주는 정상균주에서 발현되는 eIF5B보다 5%이하의 적은 양이 관찰되었다 (Fig. 3, lane 2). 그러나 높은 수의 plasmid (h.c.)를 갖는 균주 (lane 1)에서는 정상 균주에서 발현되는 eIF5B (FL)와 거의 유사한 양의 eIF5B (SL)가 발현되었다. 이러한 결과에서 eIF5B (SL)는 eIF5B (FL)와 동일한 기능을 하는 것을 알 수 있다. eIF5B의 N-말단부위인 396 아미노산잔기가 상실된 eIF5B396-1002는 정상 eIF5B와 동일한 기능을 한다는 보고는 이를 뒷받침한다(3). 배수체 및 반수체인 균주의 추출액에서는 정상적인 크기의 eIF5B뿐만 아니라 분해되어 생겼다고 사료되는 작은 크기의 eIF5B가 관찰되었다 (Fig. 3, lane 3과 4).

적은 양의 eIF5B를 사용한 in vitro translation 활성의 효과

짧은 크기의 eIF5B (SL)가 생체 내에서 적은 양으로 발현될 때 성장이 정상 균주만큼 회복되지 않았다(Fig. 2). 이러한 현상이 실제 이러한 단백질합성인자에 의해 직접적으로 일어나는지를 확인하기 위해 in vitro 상에서 단백질합성 반응을 실행하였다. 벡터, low copy 수의 *FUN12* (SL) 및 *FUN12* (FL)가 각각 전달된 *fun12Δ* 균주를 배양하고 이들을 분쇄한 후 추출액의 단백질합성 활성을 만들어진 luciferase 활성으로 조사하였다. *fun12Δ*+l.c. *FUN12*(SL)균주의 추출액은 *fun12Δ*+l.c. *FUN12*(FL)균주에 비해 단백질합성활성이 낮았다(Fig. 4). 그러나 eIF5B (SL)를 함유하는 효모의 추출액은 단백질합성활성이 eIF5B가 결핍된 효모의 추출액에 비해 약간 회복되었다. 이 결과는 짧은 크기의 eIF5B (SL)가 단백질합성과정의 제한인자로 작용하고 있음을 보여주고 있다. 결론적으로 *fun12Δ*+l.c. *FUN12*(SL) 균주는 *fun12Δ*+h.c. *FUN12*(SL) 균주에 존재하는 eIF5B의 약 5%에 해당하는 절단된 형태의 eIF5B를 생성함이 in vitro 상에서 관찰되었는데, 이러한 적은 양의 eIF5B는 in vivo에서도 활성을 나타내어 성장을 억제하는 제한인자로 작용함을 보여준다. 이와 비슷한 결과가 다른 실험을 통해서도 보고되었다(2). 단백질합성 추출액을 *fun12Δ* 균주에서 제조하여 단백질합성을 측정할 때 순수분리 된 eIF5B를 다양한 농도로 첨가하여 측정하였을 때 일정 양까지는 넣어준 eIF5B의 양에 비례하여 활성이 증가됨이 밝혀졌다(2). 그러나 이러한 생화학적인 결과에 해당하는 생체내의 실험은 얻어진 바 없다.

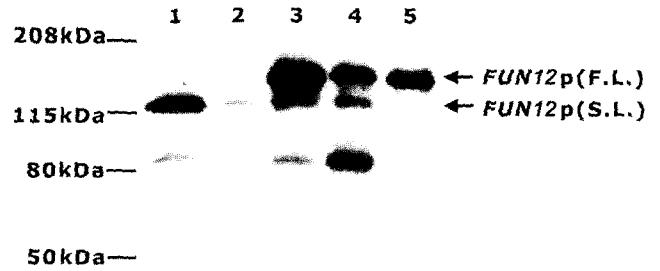


Fig. 3. Immunoblot analysis of eIF5B expression. Whole cell extracts of wild type (lane 4), diploid strain (lane 3) and transformants of *fun12Δ* strain expressing the various eIF5B constructs such as N-terminally truncated *FUN12* on low-copy-number plasmid (lane 2) and on high-copy-number plasmid (lane 1), and full-length *FUN12* on low-copy-number plasmid (lane 5) were prepared and subjected to immunoblot analysis using polyclonal antiserum raised against a GST-eIF5B fusion protein.

고 찰

본 연구를 통해서 단백질합성인자인 eIF5B의 기능이 적게 나타나는 벡터를 제조하였고, 그러한 벡터를 함유한 균주에서 단백질합성인자가 적게 발현된다는 것을 확인하였다. 생체 내에서 단백질합성 인자가 성장에 제한적인 요소로 작용하는 모델을 제시하는 데 본 연구의 의의가 있다. 이 균주는 단백질합성인자의 조절 하에 있는 유전자의 특성을 연구하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 Fig. 1에서 보여준 새롭게 제조된 *FUN12*(SL)는 거의 대부분의 프로모터가 상실되었는데도 N-말단이 상실된 eIF5B가 발현된 이유는 정확히 밝혀지지 못했다. 이에 대한 정확한 기작은 연구 중이며 두 가지 가능성이 제시될 수

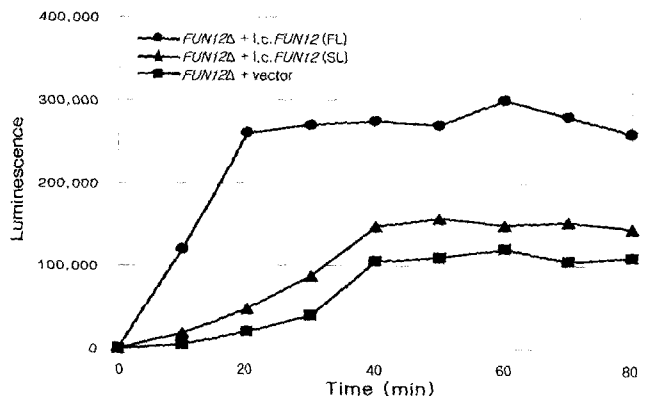


Fig. 4. Translation activity of luciferase mRNA in extract of yeast isogenic *fun12Δ* strain expressing N-terminally truncated short-length *FUN12* or full-length *FUN12* on low-copy-number plasmid. Translation activity was determined by measuring activities of luciferases formed after incubation at 25°C at the given times.

있다. 하나는 활성 있는 절단된 eIF5B를 코딩하는 *FUN12(SL)*의 5' 부위는 약 1,100bp에 해당하기 때문에 프로모터로 작용될 수 있다. 실제 세균의 경우에는 eIF5B의 유사유전자인 *infB*에 코딩되는 IF2는 정상적인 크기와 함께 작은 형태의 단백질로 발현되는 현상이 있는데, 그 크기가 98kDa, 70kDa정도에 해당되며 이 두 형태의 발현이 성장을 충분히 일어나는데 도움이 되는 활성 있는 형태이다(9, 14, 16). 두 번째는 *FUN12(SL)*가 삽입된 low copy 혹은 high copy 수의 pRS 벡터의 유전자의 전장 염기서열이 같으면서 eIF5B (SL)가 발현된 것으로 보아, pRS plasmid 내 *FUN12(SL)* 전장에 promoter로써 작용될 부위가 있을 가능성을 배제할 수 없다.

본 연구의 두 번째 의의는 eIF5B (FL)와 eIF5B (SL)가 같은 활성을 나타내며 또한 *l.c. FUN12(FL)* plasmid가 *fun12Δ*균주의 저 성장형질을 완전히 상보하여 정상균주로의 특성을 나타냄을 고려할 때(3), eIF5B가 정상 균주의 약 5% 정도 발현되었을 때 성장이 비슷한 정도로 감소된 것이다. 정상 균주에 추가적인 eIF5B를 발현시키거나 이배체 효모의 성장은 반수체 효모의 성장과 차이를 관찰할 수 없었다. 본 연구에서 얻어진 성장이 eIF5B의 발현에 의존적인 균주 즉 *fun12Δ+l.c.FUN12(SL)* 균주가 왜 성장이 느린지에 대해 다음과 같이 두 가지로 추정할 수 있다. 하나는 *fun12Δ* 균주가 적은 양의 eIF5B 발현에 의해서 세포내의 일반적인 단백질합성이 전체적으로 감소하여 성장이 정상 균주만큼 자라지 않는다. 두 번째 가능성으로는 감소된 양의 eIF5B는 단백질합성 개시과정 시 일단의 유전자군의 mRNA의 5'UTR (번역이 일어나지 않는 부위)을 선호하는 경향을 보일 것이다. 따라서 감소된 양의 eIF5B는 세포 내의 전체 유전자에 대해 서라기보다는 몇몇 성장에 중요한 유전자의 발현을 억제함으로써 그 성장을 저해 할 것이다. 단백질합성개시 인자인 eIF4E, eIF4A는 그 기능이 동물세포의 경우에 인슐린에 의해 활성화되면 전체 번역률은 2배 정도로 증가하지만 길거나 매우 구조적인 특성을 갖는 많은 암 유전자나 세포의 성장이나 증식에 중요한 유전자의 mRNA는 20 - 30배 정도로 증가되었다(8, 12, 13). 또한 이러한 mRNA의 발현은 eIF4A 및 eIF4B의 기능이 저하된 돌연변이의 경우에 우선적으로 저해되는 것으로 관찰되었다(1, 17). 이렇게 보고된 인자는 mRNA의 5'UTR에서의 helicase 활성과 관련되어 있으리라 생각되지만 eIF5B인자도 eIF1A등의 개시 인자와 더불어 5'UTR에서 48S complex를 형성하여 개시코돈을 향하여 scanning되는데 직 간접적으로 관여하리라 생각되기 때문에 위에서 보고된 현상에 해당될 가능성이 있다. 따라서 이러한 가능성을 검토하기 위해서 본 연구에서 개발한 균주를 이용하여 eIF5B가 정상 균주보다도 적게 발현되는 균주에서 다른 단백질들보다도 적게 발현되는 일군의 단백질을 탐색할 가치가 있다.

감사의 글

이 논문은 2003년 순천대학교 학술연구비 공모과제로 연구되었음

참고문헌

1. Altmann, M., P.P. Muller, B. Wittmer, F. Ruchti, S. Lanker, and H. Trachsel. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J.* 12, 3997-4003.
2. Choi, S.K., J.H. Lee, W.L. Zoll, W.C. Merrick, and T.E. Dever. 1998. Promotion of Met-tRNA_i^{Met} binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. *Science* 280, 1757-1760.
3. Choi, S.K., D.S. Olsen, A. Roll-Mecak, A. Martung, K.L. Remo, S.K. Burley, A.G. Hinnebusch, and T.E. Dever. 2000. Physical and functional interaction between the eukaryotic orthologs of prokaryotic translation initiation factors IF1 and IF2. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7183-7191.
4. Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero, and P. Hieter. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122.
5. Dever, T.E., A. Roll-Mecak, S.K. Choi, J.H. Lee, C. Cao, B.S. Shin, and S.K. Burley. 2001. Universal translation initiation factor IF2/eIF5B. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 417-424.
6. Harris, S.D., J. Cheng, T.A. Pugh, and J.R. Pringle. 1992. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *J. Mol. Biol.* 225, 53-65.
7. Hershey, J.W., and W.C. Merrick. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p. 33. In N. Sonenberg (ed.), Translation control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
8. Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115, 887-903.
9. Laalami, S., H. Putzer, J.A. Plumbridge, and M. Grunberg-Manago. 1991. A severely truncated form of translational initiation factor 2 supports growth of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 220, 335-349.
10. Lee, J.H., S.K. Choi, A. Roll-Mecak, S.K. Burley, and T.E. Dever. 1999. Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4342-4347.
11. Lee, J.H., T.V. Pestova, B.S. Shin, C. Cao, S.K. Choi, and T.E. Dever. 2002. Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16689-16694.
12. Lodish, H.F. 1976. Translational control of protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 39-72.
13. Manzella, J.M., W. Rychlik, R.E. Rhoads, J.W. Hershey, and P.J. Blackshear. 1991. Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4E. *J. Biol. Chem.* 266, 2383-2389.
14. Morel-Deville, F., G. Vachon, C. Sacerdot, A.J. Cozzone, M. Grunberg-Manago, and Y. Ceniempo. 1990. Characterization of the translational start site for IF2 beta, a short form of *Escherichia coli* initiation factor IF2. *Eur. J. Biochem.* 188, 605-614.
15. Pestova, T.V., I.B. Lomakin, J.H. Lee, S.K. Choi, T.E. Dever, and C.U. Hellen. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332-335.
16. Plumbridge, J.A., F. Deville, C. Sacerdot, H.U. Petersen, Y. Ceniempo, A. Cozzone, M. Grunberg-Manago, and J.W. Hershey. 1985. Two translational initiation sites in the *infB* gene are used to

express initiation factor IF2 alpha and IF2 beta in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 4, 223-229.

17. Svitkin, Y.V., A. Pause, A. Haghighat, S. Pyronnet, G. Witherell, G.J. Belsham, and N. Sonenberg. 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct

proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* 7, 382-394.

(Received January 26, 2004/Accepted February 25, 2004)

ABSTRACT : Construction and Characterization of Vector Expressing Low Level of Translation Factor eIF5B

Sang Ki Choi^{1*}, Jin Hee Song¹, Joon Haeng Lee², Bheong-Uk Lee³, Chi Nam Seong¹

¹Department of Biological Sciences, Sunchon National University, Suncheon 540-742,

²Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752,

³Division of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-701)

eIF5B is a translation initiation factor that delivers Met-tRNA^{Met} to AUG start codon and subsequently joins the small and large ribosomes. In order to study the function of eIF5B encoded by *FUN12*, we constructed *FUN12* which lacked 5' end of its sequence. We found that this construct lacking almost all of its promoter in pRS plasmid partially complemented slow growth phenotype of *fun12* deletion strain. Interestingly, this construct expressed N-terminally truncated eIF5B and its expression level was about 5% of that of wild type eIF5B. Low amount of the eIF5B expressed additionally in *fun12* deletion strain played a direct role as a limiting factor for its growth. This limiting factor eIF5B in those strains also modulates activities of overall translation *in vitro*.