

## *Escherichia coli* 리보핵산 내부분해효소 RNase E의 돌연변이체 선별 및 특성분석

신은경 · 고하영 · 김영민 · 주세진 · 이강석\*

중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

대장균의 필수적인 리보핵산 내부분해효소인 RNase E는 세포 내에서 여러 RNA의 분해와 가공과정에서 중요한 역할을 하며, 이 단백질의 효소활성부위를 포함하는 N-말단부위의 498 아미노산(N-Rne)만의 발현으로도 세포의 성장을 가능하게 한다. 이러한 RNase E의 특성을 활용하여 다양한 표현형을 가지는 N-Rne 돌연변이체들을 분리, 동정할 수 있는 효율적인 유전학적 시스템을 개발하였다. 이 시스템을 이용하여 얻어진 효소활성부위 돌연변이체들을 표현형으로 분류하여 분석한 결과, S1 도메인의 6번째 아미노산의 치환(I6T)을 가진 변이체는 야생형 N-Rne의 기능을 대체하지 못하였고, Small 도메인의 488번째 아미노산의 치환(R488C)을 가진 변이체는 야생형 N-Rne의 발현양보다 현저히 작게 발현시켜도 세포의 성장을 정상적으로 가능하게 하였다. 또한 DNase I 도메인의 305번째 아미노산의 치환(N305D)을 가진 변이체는 야생형 N-Rne의 발현양보다 과발현시켰을 때만 세포의 성장을 가능하게 하였다. 각각의 아미노산 치환을 포함하는 N-Rne를 한정적으로 과발현시켰을 때의 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수에 대한 영향을 측정 한 결과, 돌연변이체 N-Rne의 세포생장에 대한 영향은 이 변이체들의 세포 내 효소활성 정도에 기인하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 실험결과는 이 연구에서 개발한 유전학적 시스템을 이용하여 다양한 표현형을 가진 RNase E 변이체를 선별할 수 있으며, 이 변이체들의 특성을 분석함으로써 RNase E가 RNA의 안정성을 조절하는데 있어서 각각의 세부 도메인의 역할을 규명할 수 있으리라는 것을 시사한다.

**Key words** □ ColE1-type plasmid, degradosome, N-Rne, RNA stability, RNase E

RNA의 성숙(maturation) 속도와 안정성(stability) 정도는 유전자 발현 정도를 결정짓는 중요한 인자이다. RNA의 가공과 분해는 다양한 리보핵산 분해효소의 공동작용에 의해 이루어지며 RNA의 분해 방법에 따라 리보핵산 분해효소는 리보핵산 내부분해효소(endoribonuclease)와 리보핵산 외부분해효소(exoribonuclease)로 나눌 수 있다. *Escherichia coli*에서 mRNA의 분해에 있어서 중심적인 역할을 하는 것은 리보핵산 내부분해효소인 RNase E (Rne 단백질)로 알려져 있으며 세균에서 가장 잘 보존된 리보핵산 분해효소 중의 하나이다(1, 4, 14). RNase E는 *E. coli*가 생존하는데 있어 필수적인 단백질로서 정상적인 발현 수준을 벗어나면 세포는 생존 능력을 상실한다. RNase E는 AU 염기가 많이 존재하는 단일 가닥의 RNA를 선별적으로 절단하여 mRNA와 rRNA의 분해가 일어나게 한다(9, 32, 21, 25). 뿐만 아니라 이 효소는 tRNA, 16S rRNA 그리고 RNase P를 구성하는 M1 RNA등과 같은 non-coding RNA를 가공하는데도 기여를 한다고 알려져 있다(7, 17, 18, 12, 13).

RNase E는 1061개의 아미노산으로 이루어진 118 kDa의 단백질로서, 그 구조와 기능에 따라 크게 세 개의 도메인(domain)으로 나누어진다. Rne 단백질의 아미노기 부분의 절반은 RNA의

특정 부분을 인식해서 절단하는 기능을 가지며 이 부분을 포함하여 498개의 아미노산만이 발현된 세포도 마찬가지로 기능성을 가지며 생존 또한 가능하다(22). 최근 RNase E의 구조에 대한 연구가 진행되면서 RNase E의 효소 부분이 RNase H, S1, 5' sensor, DNase I, Zn 그리고 Small 도메인 등의 여러 작은 도메인들로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌다(2). 카르복실기 부분은 다른 RNA와 결합하는 단백질에서 많이 발견되는 아르기닌(arginine)이 많이 포함된 RNA-결합 도메인과 degradosome을 구성하는 도메인으로 이루어져 있다(30). RNA degradosome은 *E. coli*에서 RNA의 분해와 가공에 관여하는 다단백질복합체로서, 리보핵산 외부분해효소인 polynucleotide phosphorylase (PNPase)와 RhlB RNA helicase, enolase, polyphosphate kinase (PpK), poly(A) polymerase (PAPI), GroEL, DnaK 등으로 구성되어 있다(3, 16, 20, 23, 27, 31). Enolase는 당 대사에 관련된 mRNA 분해에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으며 RNA helicase는 PNPase의 효소작용이 진행될 때 방해가 되는 헤어핀(hairpin) 구조와 같은 RNA의 2차 구조를 풀어주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(24, 27). 또한 RNase E는 poly(A) polymerase, 라이보솜 단백질 S1, RNase E의 단백질 저해제로 알려진 RraA와 RraB 등이 추가적으로 결합할 수 있다(5, 6, 10, 15, 28).

RNA 전사체의 분해와 가공과정에 있어서 RNase E가 중요한 기능을 한다는 것이 널리 알려져 있음에도 불구하고 어떻게

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-2-820-5241, Fax: 82-2-822-5241  
E-mail: kangseok@cau.ac.kr

RNase E가 RNA의 특정 부분에 결합을 하고 인식을 하여 절단을 할 수 있는지, 혹은 이러한 효소의 작용을 하는데 필요한 아미노산 잔기는 무엇인지 등과 같은 분자적 기작은 거의 알려져 있지 않다. 최근 RNase E의 효소 기능을 담당하는 부분의 결정 구조가 밝혀지면서 이 효소에 대한 연구가 활발히 시도되고 있지만 이 단백질의 구조적 특이성에서 유래한 여러 가지 문제점들로 인하여 전체 단백질의 구조는 밝혀내지 못하고 있다(2). 지금까지는 RNase E의 기능을 유전학적으로 밝히기 위하여 온도 민감성 돌연변이를 이용하거나 특정 부위가 결실된 단백질을 이용한 연구가 진행되었다(26). 그러나 이 방법은 RNase E의 기능을 불활성화 시키기 위하여 온도를 높여주거나(44°C) 특정 부위의 단백질 결실로 인한 구조적 변화가 생기는 등의 문제들로 RNase E의 기능을 세포 내에서 연구하는데 한계가 있었다. 따라서 RNase E의 효과적인 유전학적인 연구를 위해서는 세포의 정상적인 기능은 저해하지 않으면서 RNA의 분해 기작에 영향을 끼칠 수 있는 여러 돌연변이들을 직접 선별할 수 있는 방법이 필요하다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 보완하여 RNase E의 돌연변이체를 효과적으로 선별하고 연구할 수 있는 시스템을 개발하였다. 이 시스템을 이용하여 RNase E의 효소활성 부분을 구성하고 있는 아미노기의 499개의 아미노산 중 하나의 아미노산의 치환으로 인해 세포 내에서 정상적인 RNase E의 기능에 변화를 가지는 돌연변이체들을 분리하고 이 변이체들의 특성을 동정하였다.

## 재료 및 방법

### 균주와 플라스미드

*me*가 제거된 *E. coli*의 균주인 KSL2000은 이전의 보고에서 설명하였다(13). N-Rne의 코딩부분에 무작위적인 돌연변이를 포함하는 pNRNE4 플라스미드(29) 라이브러리를 만들기 위해 RNase E의 효소활성부분(아미노기 1-499 아미노산)을 코딩하는 DNA 조각을 error-prone PCR을 이용해 증폭하고, *NotI*과 *XbaI* 제한효소로 분해한 후 pNRNE4 플라스미드에 같은 제한 효소 자리를 이용하여 클론하였다. Error-prone PCR 반응은 이전에 보고한 방법을 사용하였다(11). 이때 사용된 프라이머는 Nme 5': 5'-GAATTGTGAGCGGATAAC-3', Nme 3': 5'-CTACCATCGGCGCTACGT-3' 이다.

### 돌연변이체의 분리과 동정

돌연변이가 일어난 N-Rne 라이브러리를 가진 pNRNE4 플라스미드를 삽입하여 형질전환 시킨 KSL2000 균주를 1~1,000  $\mu$ M의 IPTG 또는 0.2%의 아라비노스가 첨가된 배지에 키워 표현형에 따라 분류하였다.

### Western blot 분석

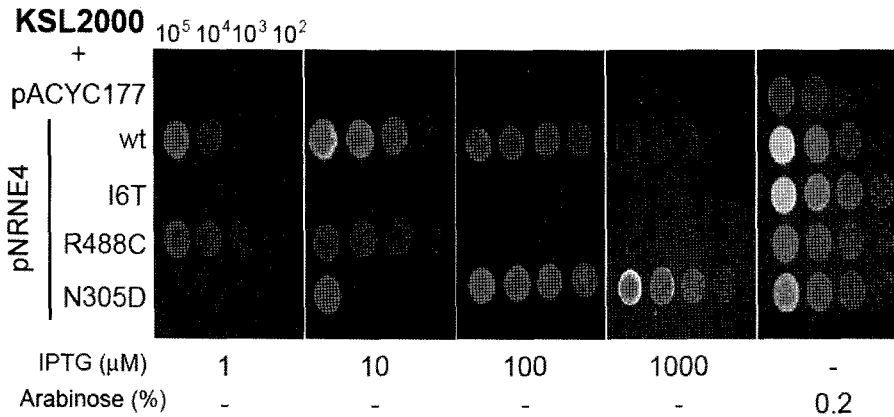
RNase E와 RNase E 돌연변이체들을 가진 KSL2000 균주를 10  $\mu$ M의 IPTG가 포함된 배지에서 키운 다음 OD<sub>600</sub>=0.2가 되면 IPTG를 100  $\mu$ M이 되게 넣어주어 N-Rne를 과발현 시키고

OD<sub>600</sub>=0.6이 될 때까지 키운다. 모아진 세포들은 PBS (phosphate buffered saline) buffer와 SDS-PAGE sample buffer (100 mM tris-Cl; pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 30% glycerol, 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 넣고 10분 동안 끓인 후 8% acrylamide 겔에서 분리하였다. 단백질 밴드의 상대적인 양은 Versa Doc 이미징 시스템과 Quantity One 소프트웨어를 이용하여 정량 하였다.

## 결과 및 고찰

Error-prone PCR을 이용하여 *rne* 유전자의 효소활성부분(아미노산 1-499)을 코딩하는 DNA에 무작위로 염기변형을 일으키고 이를 발현 벡터인 pNRNE4에 클론하여 N-Rne 돌연변이체 라이브러리를 만들었다. 이를 KSL2000 세포 내로 삽입하여 형질전환체를 만들었다. KSL2000 균주는 염색체상의 *me*가 결실되었으며, 세포 내의 RNase E는 pBAD-RNE 플라스미드로부터 발현되며, 그 발현 정도는 아라비노스(arabinose) 프로모터(PBAD)에 의하여 조절된다(13). 대장균에서 RNase E는 필수적인 단백질이기 때문에 KSL2000 균주는 아라비노스(L-arabinose)가 없는 배지에서는 살 수 없으며, 정상적인 수준의 RNase E 발현을 위해서는 0.1~0.2%의 아라비노스가 포함된 배지에서 배양하여야 한다(29). KSL2000 세포에 RNase E의 아미노기 말단의 499개 아미노산(N-Rne)을 발현시키는 pNRNE4 플라스미드를 삽입시켜 형질전환을 시키면, 이 플라스미드에서 N-Rne는 IPTG에 의해 조절되는 *lacUV5* 프로모터로부터 발현되며, 10~100  $\mu$ M의 IPTG만을 포함한 배지에서 pBAD-RNE 플라스미드로부터 RNase E가 생성되지 않더라도 KSL2000 세포의 성장을 가능하게 한다(13). N-Rne의 RNA 분해능력은 Rne에 비해 약하므로 세포 내에서 Rne의 기능을 대체하기 위해서는 정상적인 세포에서 Rne의 발현 양보다 4~5배 정도 과발현시켜야 한다. 이 시스템을 이용하여 RNase E의 효소활성 도메인의 코딩부분에 무작위적인 돌연변이를 가지는 15,000여개의 클론들을 1~1,000  $\mu$ M의 IPTG 또는 0.2%의 아라비노스가 첨가된 배지에 키워서 표현형에 따라 분류하였다.

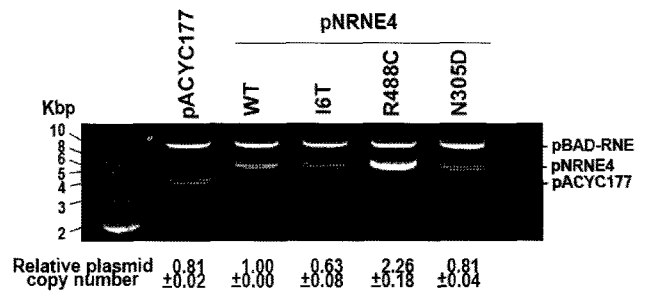
이러한 스크리닝 과정에서 크게 세 가지 유형의 표현형을 가지는 클론들을 분리할 수 있었다. 분류된 세 가지의 유형을 가진 클론들의 염기를 분석하여 각각의 유형에서 하나의 아미노산 치환을 가진 클론을 하나씩 선별하여 그 특성을 일차적으로 분석하였다. 첫 번째는 아라비노스가 있는 배지에서는 pBAD-RNE에서 발현된 RNase E에 의해 정상적으로 살 수 있지만 IPTG만 존재하는 배지에서는 그 농도와 상관없이 살지 못하는 클론들을 분리하였다. 이 클론들은 정상적인 RNase E의 기능을 대체하지 못하는(non-complementing) 변이체 N-Rne를 발현하는 KSL2000 세포라는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, N-Rne-I6T). 두 번째는 아라비노스가 없는 배지에서 IPTG의 농도가 낮을 때(10  $\mu$ M 이하)는 야생형 N-Rne가 발현된 세포보다 잘 자라지만 IPTG 농도를 증가시켜서(100  $\mu$ M 이상) 과발현 시켰을 때는 잘 자라지 못하는 클론들을 선별하였다(Fig. 1, N-Rne-R488C). 마지막으로 아라비



**Fig. 1.** Growth characteristics of cells expressing N-Rne mutants. KSL2000 cells harboring pACYC177 or pNRNE4 (wt, I6T, R488C, or N305D) were individually tested on LB-agar medium containing 1-1,000 μM IPTG for their ability to support the growth of KSL2000 cells. Approximate number of cells used in each spot is indicated.

노즈가 없는 배지에서 IPTG 농도가 낮을 때(1 μM)는 잘 자라지 못하지만 IPTG 농도를 증가시켜서(10 μM 이상) 과발현 시켰을 때는 잘 자라는 클론들을 분리할 수 있었다(Fig. 1, N-Rne-N305D).

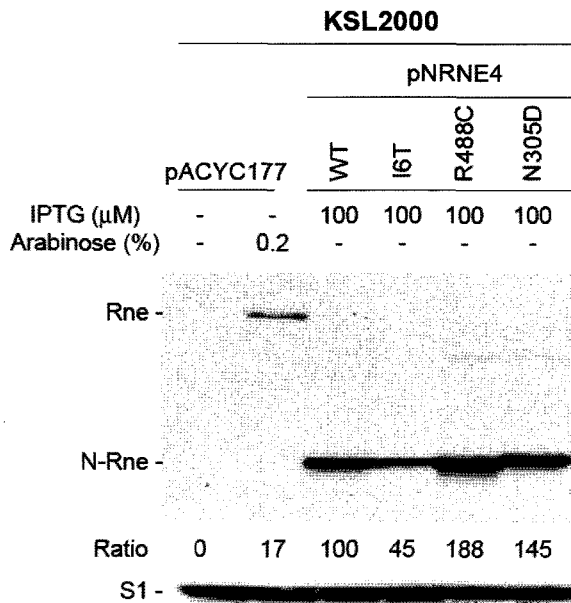
이렇게 분리한 돌연변이체들의 세포 내에서의 활성을 알아보기 위하여 야생형 N-Rne와 돌연변이체 N-Rne를 각각 발현시켜 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수(copy number)를 비교하여 보았다(Fig. 2). 대장균에서 RNase E는 플라스미드 DNA의 복제를 조절하는 안티센스 조절자인 RNAI을 절단함으로써 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수를 조절하는 것으로 알려져 있으며(19), RNase E 및 유사 단백질들의 세포 내에서의 RNA 분해능력을 측정하기 위하여 이 현상이 널리 이용되어 왔다(13, 14, 15, 33). 돌연변이체 N-Rne를 발현하는 pNRNE4 플라스미드는 ColE1-타입 플라스미드로서 이 플라스미드의 복제 수 또한 RNase E 단백질의 활성에 의해 조절된다. 따라서 세포 내에서 pNRNE4에 의해 발현된 N-Rne가 자가 조절작용에 의해 자신의 플라스미드의 복제 수를 조절하게 되고 이를 통해 돌연변이체 N-Rne의 세포 내 활성을 확인할 수 있다. 야생형 N-Rne와 돌연변이체 N-Rne를 각각 발현시켜 플라스미드의 복제 수를 비교하여 본 결과, 하나의 아미노산 치환으로 인해 야생형의 기능을 대체하지 못하는 N-Rne-I6T의 경우, 야생형 N-Rne가 발현 되었을 때에 비해 pNRNE4의 복제 수가 37% 정도 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해서 N-Rne-I6T는 대부분의 RNA 분해능력을 상실하였으며 이로 인해 세포의 성장을 가능하게 하지 못함을 확인할 수 있었다. 또한 낮은 IPTG 농도에서도 세포의 성장을 가능하게 하였던 N-Rne-R488C는 야생형 N-Rne에 비해 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수를 2배 이상 증가시켰다. 이 변이체는 야생형 N-Rne에 비하여 높은 RNA 분해능력을 가졌기 때문에 RNAI을 더 효과적으로 분해하고 그 결과 ColE1-타입 플라스미드의 복제 수가 더 증가한 고효율성(hyperactive) 돌연변이체라는 것을 확인할 수 있었다. 그리고, N-Rne-N305D의 발현은 야생형 N-Rne에 비하여 ColE1-타입 플라스미드의 복제수를 약 19%정도



**Fig. 2.** Decay of RNA I. Plasmids digested with *Hind*III restriction enzyme, which has a unique cleavage site in all plasmids tested here, were electrophoresed in 0.9% agarose gel and stained with ethidium bromide. Plasmid copy number was calculated relative to a concurrently present pSC101 derivative (pBAD-RNE), the replication of which is independent of Rne, by measuring the molar ratio of the pBAD-RNE plasmid to ColE1-type plasmid (pNRNE4 or pNRNE4-mutants) and are shown at the bottom of the gel.

감소시켰다. 이는 N-Rne-N305D는 야생형 N-Rne의 RNA 분해능력을 일부만 가지고 있으며, RNA 분해능력을 대부분 상실하여 세포의 성장을 지지하지 못하는 N-Rne-I6T보다는 높은 효소 활성을 가지지만 야생형 N-Rne에 비하여 부분적으로 효소활성을 가지고 있는(partially functional) 변이체라는 것을 확인할 수 있었다.

RNase E 항체를 이용한 Western blot 실험을 통하여 야생형 N-Rne와 변이체 N-Rne들의 세포 내 발현 정도를 비교하여 보았다(Fig. 3). 그 결과 N-Rne-I6T의 경우에는 야생형 N-Rne에 비해 RNAI을 효과적으로 절단하지 못하게 되어 ColE1-타입 플라스미드인 pNRNE4의 복제 수가 감소하게 되고 N-Rne-I6T 단백질의 발현도 역시 야생형 N-Rne에 비해 두 배 정도 감소한 것을 확인할 수 있었다. 반면 N-Rne-R488C의 경우에는 야생형 N-Rne에 비해 RNAI을 더 효과적으로 절단하여 결과적으로 ColE1 type 플라스미드인 pNRNE4의 복제 수가 두 배 가량 증가하게



**Fig. 3.** Expression profiles of Rne and N-Rne in KSL2000. To prepare total proteins from KSL2000+pACYC177 (no arabinose) or KSL2000+pNRNE4, cultures were grown to middle log phase in the presence of 0.1% arabinose, harvested, washed twice with plain Luria-Bertani (LB) medium and reinoculated into LB medium containing no arabinose ( $OD_{600}=0.1$ ). They were further incubated for 150 min ( $OD_{600}=0.6$ ) at 37°C and 250 rpm in the presence of 100  $\mu$ M IPTG to induce N-Rne expression, and harvested for total protein preparation. The membrane probed with anti-Rne monoclonal antibody was stripped and subsequently reprobed with anti-S1 polyclonal antibody to provide an internal standard. The relative abundance of protein bands were quantitated using Versa Doc imaging system and Quantity One.

되고 결국 N-Rne-R488C의 발현량도 야생형 N-Rne에 비해 약 두 배정도 증가하여 돌연변이체에 의한 플라스미드 복제수의 증가 현상이 증폭되었음을 알 수 있었다. 이는 이 유전학적 시스템의 ColE1-타입 플라스미드의 복제 현상을 이용하여, 천연생 N-Rne에 비해 조금만 차이의 RNA 분해능력을 가진 N-Rne 돌연변이체들을 쉽게 선별할 수 있음을 보여준다. 하지만, RNase E의 효소활성을 일부 상실하였다고 판단된 N-Rne-N305D 단백질의 발현양은 야생형보다 45% 증가하였다. 이는 N-Rne-N305D가 RNAI 분자에 대한 분해능력은 일부 상실하여 ColE1-타입 플라스미드의 복제수는 감소시키나, 이 변이체 단백질이 야생형에 비해 세포 내에서 분해가 천천히 일어나며 이로 인해 단백질의 반감기가 증가했다고 추론할 수 있다.

RNase E의 구조와 기능에 대한 연구는 *E. coli* 유전자 발현의 전사 후 과정의 수준에서 조절할 수 있다는 점에서 오랫동안 연구되어 왔다. 하지만 세포 내에서 RNase E가 발현되지 않으면 세포가 생존 능력을 잃어버리게 되는 문제점이 있어서 돌연변이체를 이용한 RNase E의 기능을 밝히는 데는 많은 어려움이 있었다. 이 실험에서는 세포 내 정상적인 기능에는 영향을 끼치지

않으면서 세포 내에서 다양한 기능을 가지는 돌연변이체들을 선별할 수 있는 효과적인 시스템을 이용하였다. 그 결과 하나의 아미노산 치환만으로도 야생형 N-Rne의 기능을 대체하지 못하거나 (N-Rne-I6T) 과발현시켜야 대체할 수 있는(N-Rne-N305D) 돌연변이체들뿐 아니라 RNA 분해능력이 증가한 돌연변이체(N-Rne-R488C)를 효과적으로 분리, 동정 할 수 있었다. 효소의 활성이 야생형 N-Rne보다 오히려 증가한 돌연변이체(N-Rne-R488C)의 경우 하나의 아미노산의 치환만으로 기능성이 저하되지 않고 오히려 증가함에도 불구하고 실제로 그렇게 진화가 이루어지지 않았다는 것을 생각해 볼 때 세포 내에서 RNase E가 RNA의 안정성을 조절하는데 있어서 치환된 아미노산의 부분을 통하여 RraA, RraB 등과 같은 조절자들과의 결합이 필요함을 추론해 볼 수 있다. 본 연구에서 개발한 유전학적 시스템을 이용하여 다양한 변이체들의 지속적인 선별과 특성을 규명함으로써 N-Rne의 각 도메인의 기능과 RNase E의 RNA 분해기능을 이해하는데 도움을 주리라 기대한다.

## 감사의 말

이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

## 참고문헌

1. Apirion, D. and A.B. Lassar. 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* 253, 1738-1742.
2. Callaghan, A.J., M.J. Marcaida, J.A. Stead, K.J. McDowall, W.G. Scott, and B.F. Luisi. 2005. Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* 437, 1187-1191.
3. Carposis, A.J., G.V. Houwe, C. Ehretsmann, and H.M. Krisch. 1994. Co-purification of *E. coli* RNase E and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76, 889-900.
4. Codon, C., J. Rourera, D. Brechemier-Baey, and H. Putzer. 2002. Ribonuclease M5 has few, if any, mRNA substrates in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 2845-2849.
5. Feng, Y., H. Huang, J. Liao, and S.N. Cohen. 2001. *Escherichia coli* poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. *J. Biol. Chem.* 276, 31651-31656.
6. Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C.J. Moore, S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2006. Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol. Microbiol.* 61, 394-406.
7. Gurevitz, M. and D. Apirion. 1983. Interplay among processing and degradative enzymes and a precursor ribonucleic acid in the selective maturation and maintenance of ribonucleic acid molecules. *Biochemistry* 22, 4000-4005.
8. Gurevitz, M., S.K. Jain, and D. Apirion. 1983. Identification of a precursor molecular for the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4450-4454.
9. Huang, H., J. Liao, and S.N. Cohen. 1998. Poly(A)- and poly(U)-

- specific RNA 3' tail shortening by *E. coli* ribonuclease E. *Nature* 391, 99-102.
10. Kalapos, M.P., H. Paulusb, and N. Sarkara. 1997. Identification of ribosomal protein S1 as a poly(A) binding protein in *Escherichia coli*. *Biochimie* 79, 493-502.
  11. Kim, J.M., H. Go, W.S. Song, S.M. Ryou, and K. Lee. 2006. Functional analysis of the residue 789 in *Escherichia coli* 16S rRNA and development of a method to select second-site revertants. *Kor. J. Microbiol.* 42, 156-159.
  12. Kim, S., H. Kim, I. Park, and Y. Lee. 1996. Mutational analysis of RNA structures and sequences postulated to affect 3' processing of M1 RNA, the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. *J. Biol. Chem.* 271, 19330-19337.
  13. Lee, K., J.A. Bernstein, and S.N. Cohen. 2002. RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 43, 1445-1456.
  14. Lee, K. and S.N. Cohen. 2003. A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Mol. Microbiol.* 48, 349-360.
  15. Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, Y. Feng, R. Meganathan, S.N. Cohen, and G. Georgiou. 2003. RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* 114, 623-634.
  16. Leroy, A., N.F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus, and A.J. Carpousis. 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* 45, 1231-1243.
  17. Li, Z. and M.P. Deutscher. 2002. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* 8, 97-109.
  18. Li, Z., S. Pandit, and M.P. Deutscher. 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18, 2878-2885.
  19. Lin-Chao, S., T.T. Wong, K.J. McDowall, and S.N. Cohen. 1994. Effects of nucleotide sequence on the specificity of *rne*-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *J. Biol. Chem.* 269, 10797-10803.
  20. Liou, G-G, W.-N. Jane, S.N. Cohen, N.-S. Lin, and S. Lin-Chao. 2001. RNA degradosomes exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 63-68.
  21. Masse, E., F.E. Escorcia, and S. Gottesman. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 17, 2374-2383.
  22. McDowall, K.J. and S.N. Cohen. 1996. The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding motif. *J. Mol. Biol.* 255, 349-355.
  23. Miczak, A., V.R. Kaberdin, C.-L. Wei, and S. Lin-Chao. 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3865-3869.
  24. Morita, T., H. Kawamoto, T. Mizota, T. Inada, and H. Aiba. 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphorus stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54, 1063-1075.
  25. Morita, T., Y. Mochizuki, and H. Aiba. 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small non-coding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4858-4863.
  26. Ono, M. and M. Kuwano. 1979. A conditional lethal mutation in *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 129, 343-357.
  27. Py, B., C.F. Higgins, H.M. Krisch, and A.J. Carpousis. 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381, 169-172.
  28. Raynal, L.C. and A.J. Carpousis. 1999. Poly(A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation. *Mol. Microbiol.* 32, 765-775.
  29. Tamura, M., K. Lee, C.A. Miller, C.J. Moore, Y. Shirako, M. Kobayashi, and S.N. Cohen. 2006. RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of *Escherichia coli* cells but not for colony-forming ability. *J. Bacteriol.* 188, 5145-5152.
  30. Taraseviciene, L., G.R. Bjork, and B.E. Uhlin. 1995. Evidence for an RNA binding region in the *Escherichia coli* processing endoribonuclease RNase E. *J. Biol. Chem.* 270, 26391-26398.
  31. Vanzo, N.F., Y.S. Li, B. Py, E. Blum, C.F. Higgins, L.C. Raynal, H.M. Krisch, and A.J. Carpousis. 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* 12, 2770-2781.
  32. Walsh, A.P., M.R. Tock, M.H. Mallen, V.R. Kaberdin, A.V. Gabain, and K.J. McDowall. 2001. Cleavage of poly(A) tails on the 3'-end of RNA by ribonuclease E of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 29, 1864-1871.
  33. Yeom, J.-H. and K. Lee. 2006. RraA rescues *Escherichia coli* cells over-producing RNase E from growth arrest by modulating the ribonucleolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1372-1376.

(Received October 31, 2007/Accepted December 10, 2007)

#### ABSTRACT: Identification and Functional Analysis of *Escherichia coli* RNase E Mutants

Eunkyoung Shin, Hayoung Go, Youngmin Kim, Sejin Ju, and Kangseok Lee\* (Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea)

RNase E is an essential *Escherichia coli* endoribonuclease that plays a major role in the decay and processing of a large fraction of RNAs in the cell and expression of N-terminal domain consisted of 1-498 amino acids (N-

Rne) is sufficient to support normal cellular growth. By utilizing these properties of RNase E, we developed a genetic system to screen for amino acid substitutions in the catalytic domain of the protein (N-Rne) that lead to various phenotypes. Using this system, we identified three kinds of mutants. A mutant N-Rne containing amino acid substitution in the S1 domain (I6T) of the protein was not able to support survival of *E. coli* cells, and another mutant N-Rne with amino acid substitution at the position 488 (R488C) in the small domain enabled N-Rne to have an elevated ribonucleolytic activity, while amino acid substitution in the DNase I domain (N305D) only enabled N-Rne to support survival of *E. coli* cells when the mutant N-Rne was over-expressed. Analysis of copy number of ColE1-type plasmid revealed that effects of amino acid substitution on the ability of N-Rne to support cellular growth stemmed from their differential effects on the ribonucleolytic activity of N-Rne in the cell. These results imply that the genetic system developed in this study can be used to isolate mutant RNase E with various phenotypes, which would help to unveil a functional role of each subdomain of the protein in the regulation of RNA stability in *E. coli*.