

송아지 흉선의 本性 및 變性 DNA 의 三次元的
構造變移에 미치는 스페르민의 差別的 效果

高東成¹ · 許 準

忠南大學校 理科學 化學科

(1982. 2. 2 접수)

Differential Effect of Spermine on Native and Denatured
Calf Thymus DNA in Their Conformational Transition

Thong-Sung Ko¹ and Joon Huh

Department of Chemistry, College of Sciences, Chungnam National University,

Dae Jeon 300-31, Korea

(Received December 2, 1982)

DNA의 functional conformation transition 특히 cooperative 構造變移 연구의 일환으로서 calf thymus DNA의 구조변이에 對한 spermine의 영향을 연구하는 중에 calf thymus DNA는 變性되어 그 三次元的 구조가 달라져도 DNase에 대한 分解率(susceptibility)이 달라지지 않으나, spermine에 의하여 이들 두 DNA 構造의 DNase에 대한 분해율이 相反의인 영향을 받게 된다는 연구 결과를 얻은 바 있는데¹, 이는 基質分子的 삼차원적 구조변이가 spermine 등의 ligand가 介在되므로써 酵素들의 functional system에 依하여 認知 될 수 있음을 보여주는 흥미로운 연구 결과라고 생각된다. 基質의 삼차원적 구조변이에 따라 일어날 수 있는 酵素的 機能 作用의 변화를 고려하지 않는 경우 核酸代謝 메카니즘의 연구에 많은 혼란이 일어날 수 있다는 점을 지적한 바 있다².

本 연구에서는 native 및 denatured DNA의 DNase에 대한 분해율에 미치는 spermine의 相反의 영향 메카니즘을 밝힐 目的으로 이들 두 構造 (native 및 denatured) DNA에 미치는 sper-

mine의 차별적 영향을 viscometric 및 spectroscopic titration 테크니크를 써서 연구하였다. 이러한 연구는 spermine과 같은 polyamine類가 native 및 denatured DNA 構造의 monomolecular condensation 및 intermolecular aggregation 등의 functional 구조변이에 미치는 영향을 알아 내는데 도움이 되는 정보를 얻는 데도 도움이 될 것이다.

실험방법 및 재료

사용한 calf thymus DNA는 미국 Sigma社로부터 구입하였으며 熱變性(denatured) DNA는 波長 260nm에서의 吸光度가 1.6이 되는 DNA水溶液을 끓는 물 속에서 20분간 가열한 後 얼음물에서 急冷却 시켜서 제조하였다.

分光學的 測定. 상온에서 Pye Unicam SP 1800 분광광도계를 使用하였다. DNA 구조변이에 따른 DNA의 DNase에 대한 민감도(susceptibility) 시험에 使用 하였던 완충용액을 本 실험에 使用 하였으며 그 最終 成分 濃度는 0.03 M MgCl₂ 및 0.05 M NaCl을 含有하는 0.008 M 아세트酸 완충용액(standard acetate buffer pH 7.0)이었으며 필요에 따라서 spermine의 適當量

을 吸光度 測定 直前에 그 완충용액 內 DNA 용액에 加하여 주었다.

Viscometric Titration. Ostwald type viscometer를 사용 하였으며 항온저를 써서 一定한 온도 (26°C)로 유지 하였다. 사용된 buffer는 분광학적 적정 실험에 사용한 acetate buffer이며 spermine을 加하여 줄 경우에는 viscosity 측정 직전에 항온저 온도 (26°C)에서 preincubation된 것을 DNA 용액에 加하여 주었다. Flow time 들은 최소 삼중으로 0.1초의 정밀도로 측정하였는데 측정치의 평균편차는 0.1~0.2초, 즉 약 0.1%이었다.

결과 및 고찰

Native 및 denatured DNA의 spermine에 의한 viscometric titrations를 나타내는 Fig.1에서 native DNA의 점성도는 denatured DNA의 것보다 크지만 그 flow time은 denatured DNA에 비하여 spermine 농도가 약 $1.3 \times 10^{-3} M$ 에 이르기까지 spermine 농도가 증가함에 따라서 급격하게 감소됨을 볼 수 있으나 spermine의 농도가 약 $3.3 \times 10^{-3} M$ 이상으로 증가하게 되면 오히려 denatured DNA의 flow time이 native DNA의 것보다 커지며 그 증가율도 native DNA 보다 커짐을 볼 수 있다. Denatured DNA도 spermine 농도 증가에 따라서 그 flow time이 완만하게 약간 감소되나 spermine의 농도가 더욱 증가함에 따라서 native DNA 보다 더 빠른속도로 증가하게 됨을 볼 수 있다. 이 결과로부터 spermine에 의한 이들 두 conformation이 상이한 DNA들의 삼차원적 구조변이를 추리하여 보면 다음과 같다. Native DNA는 denatured DNA보다 더 뻗뻗한 extended structure를 가짐으로써 보다 더 큰 점성도를 가지나 cation인 spermine의 농도가 증가함에 따라서 native DNA 및 denatured DNA가 다같이 Manning's counterions condensation theory^{4,5}에 따르는 구조의 monomolecular condensation이 일어나 더욱 compact 구조를 이루게 되나 spermine 농도 증가에 따라 그렇게 되는 속도가 native DNA 쪽이 denatured DNA 보다 월등히 크다고 추리된

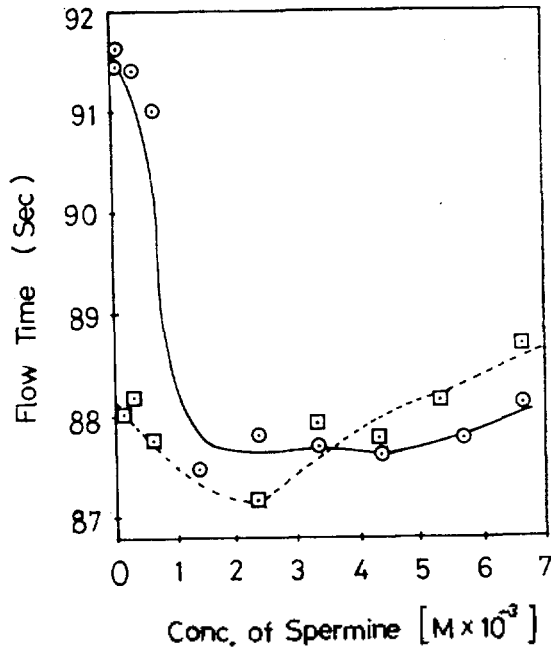


Fig.1. Viscometric titrations of the effects of spermine concentration on native (○) and denatured (□) DNA in the standard acetate buffer at 26°C. The concentration of the both conformation species of DNA was $1.73 \times 10^{-4} M$, nucleotide phosphorus.

다. 이 flow time 측정으로부터 추리되는 native DAN의 가장 compact structure를 이루게 되는 spermine의 농도 즉 $3 \times 10^{-3} M$ 영역은 DNase 1에 對한 native DNA의 susceptibility가 최대로 되는 optimum spermine 농도와 거의 일치됨을 알 수 있었다. 더욱 더 spermine 농도가 증가함에 따라서 flow time이 증가하게 됨은 처음에는 spermine에 의하여 주로 monomolecular condensation을 일으킨 DNA 분자들이 spermine 농도가 더욱 증가함에 따라서 intermolecular interaction에 의한 aggregation을 하게 되는 것으로 해석되며, denatured DNA가 native DNA보다 spermine에 의한 intermolecular aggregation 속도가 훨씬 추측할 수 있으며 큰 spermine 농도에 의한 DNA의 DNase 1에 對한 susceptibility의 감소는 기질 DNA의 이러한 intermolecular interaction에 기인하리라고 생각된다. native DNA와 denatured DNA의 DNase 1에

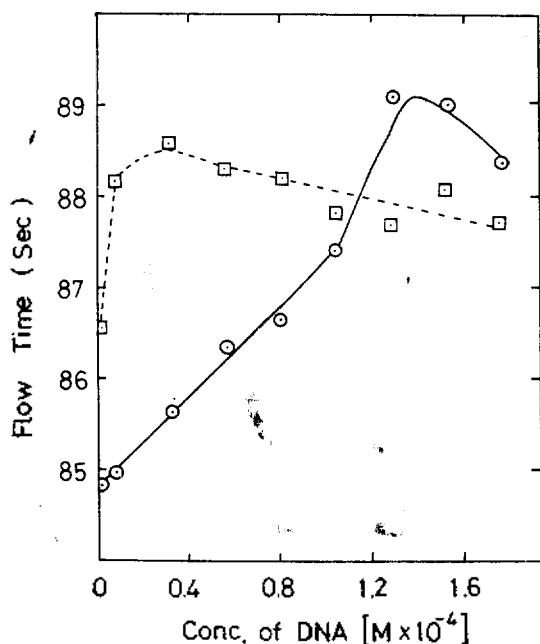


Fig. 2. The dependence of the viscosity expressed by flow time (Sec.) on the DNA concentration (native, \odot ; denatured, \square) in the presence of spermine at the concentration of $3.33 \times 10^{-3} M$. Other experimental conditions are the same as described in Fig. 1.

對한 susceptibility에 對한 spermine의 상반된 효과는 DNA의 이들 두 conformation species의 spermine에 의한 구조 변이의 차이에 기인한다고 볼 수 있을 것이다. 즉, spermine에 의하여 native DNA는 monomolecular condensation을 하여 compact structure를 형성하지만 denatured DNA는 처음엔 약간의 condensation을 일으키나 이와 대조적으로 intermolecular aggregation을 이루는 경향을 가졌음을 예측할 수 있다. Fig. 2에서는 일정 spermine 농도 즉 $3.3 \times 10^{-4} M$ spermine에서 DNA 농도 증가에 따른 flow time을 보여 준다. Denatured DNA는 native DNA보다 더 큰 intermolecular aggregation 경향을 가졌다면 일정한 spermine 농도 下에서 DNA 농도 증가에 따른 flow time 증가 속도가 native DNA의 것보다 더 크리라고 예상되는 바 Fig. 2는 이러한 예상과 일치됨을 알 수 있다. 즉 denatured DNA는 DNA

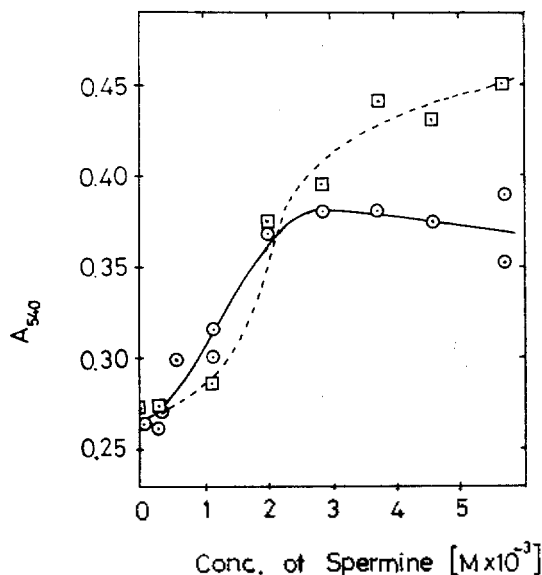


Fig. 3. Spectrophotometric titrations of the effects of spermine at the wavelength of 540nm on native (\odot) and denatured (\square) DNA. The concentration of both conformation species of DNA was $1.38 \times 10^{-4} M$ nucleotide phosphorus.

농도 증가에 따라 급격한 flow time 증가를 보이거나 이와 대조적으로 native DNA는 비교적 완만한 flow time 증가를 보이며 두 conformation species가 흔히 plateau에 도달됨을 보여준다. 이상의 viscometry의 결과를 확인하기 위하여 분광학적 시험을 하였다. Fig. 3에서는 native 및 denatured DNA 각각에 對하여 spermine 농도 증가에 따른 intermolecular aggregation에 기인하는 것으로 사료되는 파장 540nm에서의 흡광도의 증가를 조사하였다. 이 Fig.에서 denatured DNA는 native DNA와는 달리 spermine 농도 증가에 기인하는 파장 540 nm에서의 흡광도의 증가가 cooperative하게 일어나며 native DNA보다 그 흡광도의 증가율이 큰을 알 수 있으며 viscometry에서의 결과들을 뒷받침하여 주는 결과라고 생각된다.

이상의 分光學的 實驗 및 viscometry 실험들로부터 본 실험에 사용된 calf thymus DNA는 낮은 spermine 농도 下에서는 spermine이 counterion으로 作用하여 monomolecular condensation

이 일어나 compact structure 를 이루게 되며 native DNA 와 denatured DNA 는 spermine 에 의한 이러한 삼차원적 구조 변이에 차이가 있음을 알 수 있다. 즉 denatured DNA 는 native DNA 와 대조적으로 spermine 에 의한 intermolecular aggregation 에 예민하다고 볼 수 있다. 以前の 연구 결과¹로서 native DNA 와 denatured DNA 의 DNase 1 에 對한 susceptibility 에 對하여 상반적인 효과를 가짐을 알았는데 그러한 효과의 메카니즘에 대하여 결국 denatured DNA 가 native DNA 에 비하여 spermine 에 의한 intermolecular aggregation 에 예민하기 때문이라는 結論을 本 研究에서 얻을 수 있을 것이다.

모든 生命體에 존재하는 DNA 의 대부분은 compact form 으로 存在하며 최근에 DNA 의 virus(특히 bacteriophage) heads 로의 packaging 기구에 對한 연구가 해외에서 行하여지고 있으나^{6,7} 그 메카니즘이 아직 잘 解明되지 못한 초보적 단계에 지나지 않으며 이러한 연구는 DNA 의 기능적 다형성의 解明에도 도움이 될 것이다.

감 사

本 研究는 韓國科學財團의 研究費 支援에 의하여 이루어 졌으며 이에 對하여 感謝드린다.

인 용 문 헌

1. T-S. Ko, J. Huh, C-B. Lee and M-K. Park Opposite Effect of Spermine on the Susceptibility of Native and Denatured Calf Thymus DNA for DNase 1 *J. Korean Chem. Soc.* **27**, 429(1983).
2. T-S., Ko, *Biosystems.* **6**, 205 (1975).
3. B. N. Ames and D. T. Dubin, *J. Biol. Chem.*, **325**, 769 (1960).
4. G. C. Manning, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978).
5. R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, **18**, 2192 (1979).
6. L. C. Gosule and J. A. Schellman, *Nature (London)* **259**, 333 (1976).
7. D. K. Chattoraj, L. C., Gosule and J. A., Schnellman, *J. Mol. Biol.*, **121**, 327 (1978).