

## Spermine에 의한 Ethidium의 Calf Thymus DNA와의 결합 Cooperativity 변화

高東成<sup>1</sup> · 許 準 · 李 康 容  
忠南大學校 理科學 化學科  
(1982. 10. 4 접수)

### Change in the Binding Cooperativity of Ethidium with Calf Thymus DNA, Induced by Spermine Binding

Thong-Sung Ko<sup>1</sup>, Joon Huh and Chan Yong Lee

Department of Chemistry, College of Sciences, Chungnam National University

(Received October 4, 1982)

**要 約.** 송아지 胸線 DNA의 nucleotide 당 spermine 0.016 분자의 비율로 결합되는 spermine 농도에서 그 DNA와 ethidium과의 결합에 대한 Hill 계수는 1.7인 반면에 spermine이 존재하지 않는 조건에서는 그 Hill 계수가 0.38이었다. Spermine에 의한 DNA의 viscometric titration data, 260 nm에서의 anomalous absorbance-temperature profile 및 粘性度-溫度 樣相과 더불어 이 data를 기초로 하여 spermine 결합에 의하여誘發되는 conformational transition의 allosteric propagation이 DNA의 凝縮된 構造로의 單分子的 collapse에 관여됨을 豫測할 수 있다.

**ABSTRACT.** At the spermine concentration to cover the number of the binding site of spermine 0.016 per nucleotide, the Hill coefficient of the ethidium binding to the calf thymus DNA was 1.7, while the value was 0.38 in the absence of the spermine. On the basis of the data, together with other present data on the viscometric titration of the DNA with spermine and anomalous absorbance-temperature profile at 260nm and viscosity-temperature profile, it can be speculated that allosteric propagation of the conformational transition induced by the binding of the spermine may be involved in the monomolecular collapse of the DNA to a condensed structure.

#### 序 論

生理的 pH에서 陽荷電을 갖는 spermine과 같은 polyamines는 polyanion으로 존재하는 DNA와 결합하여 그 *in vivo* 生理的 意義는 아직 수립되지 못하고 있으나 DNA의 삼차원적 구조 (conformation) 변화 및 그에 따른 機能的 性質에 重要的 影響을 미칠 수 있다<sup>1-5</sup>. 그러한 影響들中 特히 spermine 등의 polyamines가 個別的 phage DNA를 phage 粒子들의 크기로 凝縮

(collapse) 시킬 수 있음이 알려져 있다<sup>6-13</sup>. Virus內 DNA의 여러가지 分子種에 의한 packaging 뿐 만 아니라 實際 모든 生命體內 DNA의 majority가 compact form으로 존재한다. 高等生物에 있어서는 histones가 DNA의 packaging에 重要的 役割을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나 aqueous salt內 DNA는 긴 線狀의 worm-like coil 構造를 가지므로 short-range bending을 일으키기 어려우며, high linear

charge density에 의한 strands間的 反撥 및 凝縮에 따르는 entropy 減小 때문에 이와같은 凝縮은 熱力學的으로 어려운 過程으로 보인다.

따라서 이들 polycation들과 DNA와의 相互作用에 關한 研究가 重要한 研究課題로 되어 있으나 그 凝縮된 粒子들의 構造 뿐 만 아니라 이러한 DNA의 凝縮에 對한 mechanism이 現在 알려져 있지 않은 實情이다. 最近에 Wilson과 Broomfield는<sup>12,13</sup> Manning's polyelectrolyte theory를<sup>15</sup> 適用하여 DNA의 counterion-induced condensation을 報告한 바 있으나 polyethylene oxide와 같은 中性 polymer들에 의한 DNA 凝縮 誘發의<sup>16</sup> 경우 등은 說明이 어려울 뿐만 아니라 모든 ion들을 單純한 point charge로 다루고 있으므로 重要한 여하한 特異한 ion effects들도 無視되고 있다. 그러나 本 研究에서는 이들 無視된 特異한 ion 效果들이 DNA의 凝縮에 대단히 重要한 factor들이라고 생각될 뿐만 아니라 DNA의 凝縮機構에 이들에 依하여 調節되는 DNA 構造의 cooperative transition이 重要한 役割을 하고 있다고 생각된다.

本 研究에서는 이러한 推理를 뒷받침하기 爲하여 DNA의 monomolecular condensation이 spermine에 依하여 cooperative 過程으로 일어남을 確認하고 동시에 spermine에 依한 이러한 DNA의 凝縮시 다른 ligand(ethidium) binding에 對한 binding cooperativity 特性이 變化됨을 觀察하여 spermine에 依한 DNA 構造 變移에 基因하는 allosteric effects의 transmission이 spermine에 依한 DNA의 凝縮時에 誘發됨을 보여 주고자 한다.

#### 實驗方法 및 材料

平衡透析에 依한 스페르민·4 HCl의 DNA에의 結合 試驗

사용된 송아지 胸線 DNA(Type I)는 美國 Sigma Chemical Company로 부터 購入하였다. 그 DNA 溶液은 0.001 M EDTA를 含有하는 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹여 만들어졌으며 DNA의 濃度は 吸光係數  $\epsilon_{260} = 6600 M^{-1}cm^{-1}$ 를 사용하여 뉴클레오티드 인(nucleotide phos-

phorus)으로 나타내었다. 平衡透析 實驗은 셀룰로스 透析管(Union Carbide社)을 사용하였으며 DNA와 스페르민 溶液을 透析管 속에 넣고 同一한 완충액에 對하여 常溫(20°C)에서 약 20時間 平衡에 到達 될때까지 透析시킨 다음 DNA에 結合된 스페르민의 濃度は 透析管 内部 全體 濃도와 外部 濃도와의 差異로써 求하였다. 이 때 스페르민의 濃度は 2,4-디니트로플루오르벤젠을 사용하는 디니트로플루오르벤젠 方法(dinitrofluorobenzene procedure)으로 決定하였다<sup>17</sup>.

DNA 構造 變移에 따른 에티듐(Ethidium)의 DNA와의 結合 特性 試驗

스페르민에 依한 DNA 構造의 變化에 對한 증거를 얻기 爲하여 스페르민이 없는 경우와 스페르민이 存在할 경우( $3 \times 10^{-4} M$ )에 對하여 各各 에티듐 結合 樣相들을 試驗하였다. 에티듐의 DNA에의 이 結合 試驗은 0.06M 인산 완충액(pH 7.0)을 써서 常溫(20°C)에서 Pye Unicam SP 1800 Spectrophotometer(分光光度計)를 사용하여 에티듐(ethidium)을 DNA로 波長 520 nm에서 分光學的 滴定(spectrophotometric titration)을 하여주는 方法을 사용하였다.

粘性度 測定

前에<sup>18</sup> 報告된 바와 같이 粘性度 測定을 하였다. spermine에 依한 粘性度 測定時에는 粘性度 測定 直前に 恒溫槽 溫度(26°C)에서 preincubation된 것을 DNA 溶液에 加하여 주고 잘 섞어 주었다. 溫度 增加에 따른 粘性度の 變化에 對한 實驗에서는 粘度計가 담겨진 硝子 bath에 Haake Constant Temperature Bath Circulator의 unit를 담가서 그 bath의 溫度를 調節 維持하였다.

#### 結 果

스페르민의 DNA와의 平衡 結合 特性

0.06M 인산 완충용액 內(pH 7.0), 20°C에서 平衡透析에 依하여 調査한 스페르민의 DNA와의 平衡結合의 結果를 Scatchard plot 한 Fig. 1의 그 線과 橫 座標 軸( $\bar{V}$ )과의 절편(intercept)으로부터 얻어지는 뉴클레오티드당 總 結合자리數( $n$ )와 그 線의 기울기로부터 얻어지는  $K$  결합

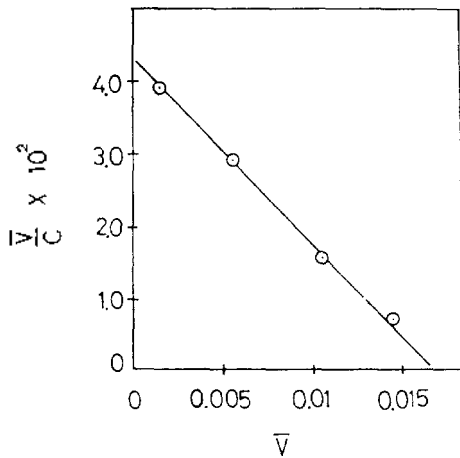


Fig. 1. Scatchard plot of spermine binding to calf thymus DNA at 20°C in the phosphate buffer (pH 7.0) composed of 0.06M phosphate and 0.001M EDTA.  $\bar{V}$ : Moles of spermine bound per mole nucleotide; C: Molar concentration of free spermine.

의 값은 각각  $n=0.016$  및  $Kb=2.7 \times 10^4$ 이다. 스페르민은 주어진 조건에서 DNA와 cooperative binding을 하지 않음을 알 수 있다.

에티듐의 DNA와의 결합 특성에 미치는 스페르민의 영향

에티듐을 DNA 용액으로 분광학적인 적정(spectrophotometric titration)을 하여 줄 때 DNA에 결합되지 않고遊離(free)된 에티듐은 480 nm에서 최대 흡광도를 갖지만 DNA에 완전히 결합됨에 따라서 hypochromicity를 나타내며 최대 흡광 波長이 520nm로 옮겨지고 略 510nm에서 等吸光點(isobestic point)을 갖는다. (Fig. 2 참조). DNA로 에티듐을 적정함에 따른 波長 520nm에서의 fractional absorbance( $\theta$ )의 증가에 대한 그래프를 스페르민이 존재하지 않을 경우와 스페르민이 존재할 경우 모두 Fig. 3에서 보여준다. 스페르민이 존재하지 않는 경우에는 에티듐과 DNA가 negative cooperative binding을 하지만 스페르민이 존재하는 경우는 에티듐과 DNA가 positive cooperative binding을 하게 될 수 있다. 스페르민의 존재 여부에 따른 이들 결합의 특성을 더 자세히 알기 위하여 이

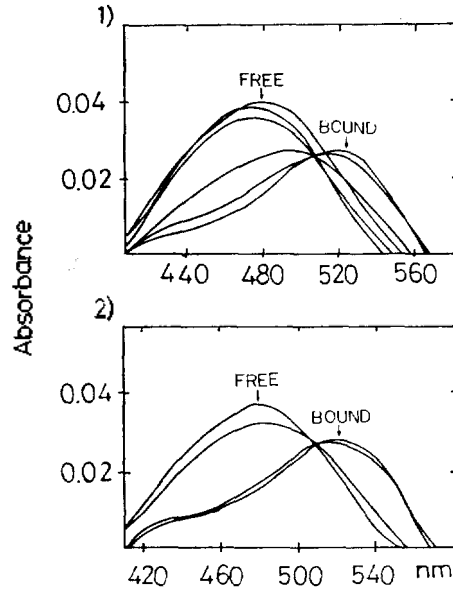


Fig. 2. Absorption spectra resulting from the interaction of ethidium bromide with calf thymus DNA at 20°C and pH 7.0 in the phosphate buffer in either presence ( $3.33 \times 10^{-4}M$ ) or absence of spermine. Total constant concentration of ethidium bromide ( $7 \times 10^{-6}M$ ) was titrated with varying concentration of DNA species. 1) native DNA, minus spermine; 2) native DNA, plus spermine.

들 그림을 다음과 같이誘導될 수 있는 empirical Hill plot로서 調査하였다.

$$\begin{aligned} nEb + \text{DNA} &\rightleftharpoons \text{DNA} \cdot Eb_n \\ Eb + \frac{1}{n}\text{DNA} &\rightleftharpoons \frac{1}{n}\text{DNA} \cdot Eb_n \\ K_{app} &= \frac{[\text{DNA}]^{\frac{1}{n}} [Eb]}{[\text{DNA} \cdot Eb_n]^{\frac{1}{n}}} \\ &= \frac{1-\theta}{\theta} [\text{DNA}]^{\frac{1}{n}} \\ \log \frac{1-\theta}{\theta} + pK_{app} &= -\frac{1}{n} \log [\text{DNA}] \\ \theta &= \frac{[\text{DNA} \cdot Eb_n]^{\frac{1}{n}}}{[Eb] + [\text{DNA} \cdot Eb_n]^{\frac{1}{n}}} \end{aligned}$$

$-\log [\text{DNA}]$ 에 대하여  $\log \frac{1-\theta}{\theta}$ 의 그래프를 그리면 기울기  $1/n$ 로부터  $n$ 의 값을, 그리고 縱座標(y)軸과 그래프線과의 절편에서  $pK_{app}$ 의 값을 각각求할 수가 있다. Fig. 3의 각 경우, DNA의 뉴클레오티드 인으로 表示된 약  $10^{-4.3}$

~10<sup>-5.3</sup>M 濃度 범위에 對한 Hill plot (Fig. 4)에서 求한 *n*의 값과 p*K*<sub>app</sub>의 값들이 Table 1에 실려 있다. Calf thymus DNA는 스페르민이 存在하지 않을 경우는 대략적으로 *n*=0.38이며

Table 1. Effect of spermine on the Hill plot of ethidium binding with calf thymus DNA

| Spermine, plus or minus                                   | Minus | Plus |
|---|-------|------|
| Hill coefficient, <i>n</i>                                | 0.38  | 1.7  |
| Apparent dissociation constant, p <i>K</i> <sub>app</sub> | 2.6   | 0.2  |

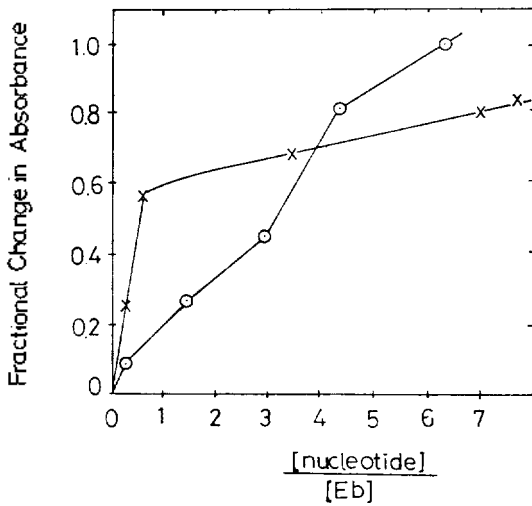


Fig. 3. Fractional change in absorbance ( $\theta$ ) at 520 nm vs. [nucleotide]/[Eb], in the phosphate buffer, without spermine (○) and with spermine (×) at 20 °C.

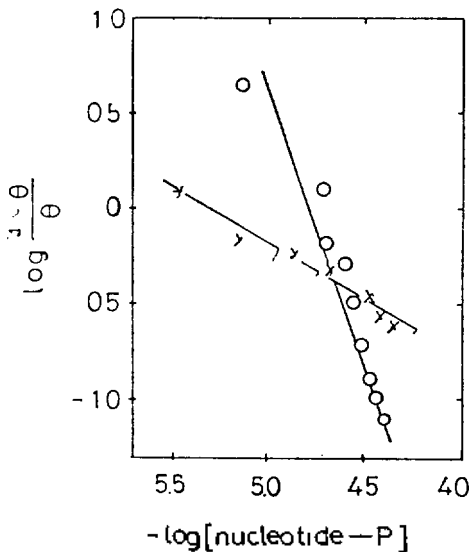


Fig. 4. Hill plot of ethidium binding with DNA at 20°C and pH 7.0 in the phosphate buffer composed of 0.06M phosphate and 0.001M EDTA. ○: Minus spermine. ×: Plus spermine.

따라서 에티듐이 negative cooperative binding을 하지만 스페르민이 존재할 경우에는 대략적으로 *n*=1.7로서 positive cooperative binding을 하게 됨을 알 수 있다. 이 實驗 條件에서 스페르민의 DNA에의 結合자리 數는 뉴클레오티드당 0.016이므로 스페르민 분자 한개가 4개의 인산기와 結合된다고 假定할 지라도 불과 약 6~7%의 뉴클레오티드인들만이 스페르민 분자와 直接 接觸하고 있으며, DNA의 약 94내지 93%는 free한 狀態로 남아 있다고 볼 수 있을 것이다.

따라서 스페르민이 자기가 結合하는 자리 이외의 전체 DNA의 構造에 影響을 미치지 않는다면 스페르민이 結合되지 않은 경우와 마찬가지로 에티듐의 結合이 일어나야 함에도 불구하고 *n* 값이 커지고 p*K*<sub>app</sub> 값이 약 1/10 보다 더 작아짐은 結合된 스페르민이 직접 結合되지 않은 전체 DNA 構造에도 간접적으로 影響을 미침으로써 cooperativity 變化가 誘發됨을 알 수 있다. 즉 이와 같은 경우 結合된 spermine이 전체 DNA의 構造 變移를 誘發시켜 立體的으로 떨어져 있는 部分의 리간드(에티듐)의 結合에 allosteric 效果를 가진다는 것을 알 수 있다. 本研究에서 探究한 DNA內 構造 變移의 allosteric propagation(波及效果)는 supramolecular assemblies 또는 그 수준 以上の biosystem에 있어서 相異한 macromolecular component 사이에도 可能함을 推理할 수 있다.

스페르민에 依한 本性 및 變性 각 DNA의 Viscometric Titrations.

前述한 觀察들과 有關한 三次元的 構造 變移에 對한 情報를 얻기 위하여 viscometric titration을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 比較的 낮은 spermine 濃度 범위에서 spermine

濃度 增加에 따라서 native DNA 는 그 viscosity (flow time)가 急激한 減少를 일으켜  $2 \times 10^{-3} M$  乃至  $3 \times 10^{-3} M$  spermine 濃度에서 最小의 plateau flow time 을 가지며 spermine 濃度가 더욱 增加함에 따라서 서서히 viscosity 가 조금씩 增加됨을 볼 수 있다. 이와 對照의으로 denatured DNA 는 spermine 濃度 增加에 따라서 그 flow time 이 完滿하게 약간 減少되나 native DNA 가 갖는 spermine 濃도에 抵抗인 粘性度 plateau 영역 없이 spermine 의 濃度가 더욱 增加함에 따라서 native DNA 보다 더 빠른 속도로 그 粘性도가 增加함을 알 수 있다.

Native DNA 의 denatured DNA 와는 對照인 spermine 에 의한 급격한 viscosity 의 減少는 native DNA 의 크기와 shape 의 drastic cooperative change 가 수반되는 monomolecular condensation 이 일어남을 뒷받침하여 준다. 이러한 三次元的 構造의 cooperative transition 은 前述한 本 研究 結果 즉 DNA 의 한 部位에 結合된 spermine 이 그 結果 誘發되는 三次元的 構造 變移의 allosteric 波及效果에 의하여 그 DNA 의 spermine-free 部位의 ethidium 등의 ligand 結合에 對한 allosteric 效果의 原因이 되는 構造 變移라고 사료된다. 前에 報告된 다른 DNA system 들에 對한 實驗 data 도<sup>9,12</sup> 이와 같은 本 研究의 推理를 支持해 준다고 생각된다. 다시 말하면 本 研究 結果는 spermine 에 의한 송아지 흉선 DNA 의 collapse 가 spermine 에 의한 allosteric propagation 과정이 개재되는 cooperative process 임을 보여 준다. secondary structure 가 결핍되는 denatured DNA 에서는 spermine 에 의한 viscometric titration 實驗에서 이러한 monomolecular condensation 보다는 intermolecular aggregation 의 傾向을 엿볼 수 있으므로 本 研究에서 spermine 에 의한 DNA 의 monomolecular condensation 狀態로의 packaging 에 DNA 의 secondary structure 의 存在가 重要함을 보여 준다.

Suwalsky 等의<sup>5</sup> spermine-DNA 複合體의 X線 解析 data 에 依하면 spermine 의 結合은 DNA 와 DNA 의 分子間 架橋와 1 分子中의 DNA 의

(shallow) minor groove 을 橫斷하는 結合 두 가지로 되어 있다고 볼 수 있다<sup>19</sup>. Fig. 5에서 보는 바와 같이 낮은 spermine 濃度에서는 native DNA 의 monomolecular condensed 構造가 維持되지만 spermine 濃度가 높아지면 서서히 intermolecular aggregation 이 일어나 viscosity 가 增加됨을 볼 수 있으며 이 結果는 낮은 spermine 濃度가 Escherichia coli chromosome 構造의 intactness 를 保存하는데 重要하다는 以前의 報告와<sup>20</sup> 부합된다.

낮은 spermine 濃度에서 spermine 은 DNA 와의 그 두가지 結合 方式 中 DNA 와 DNA 의 intermolecular cross-link 보다는 1 分子中의 DNA 의 double helix 의 minor groove 에 結合하여 들어감으로써 DNA 의 monomolecular condensation 構造로의 變移 및 構造 維持의 重要한 역할을 할 수 있다고 생각할 수 있다. 다시 말하자면 DNA strand 間 反撥하고 있는 陰電荷를 spermine 이 中和함으로써 DNA 의 collapse 를 誘發하고 monomolecular condensed 構造를 安定化

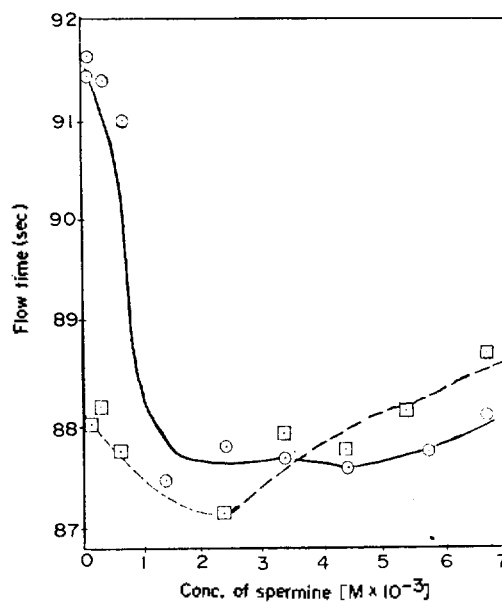


Fig. 5. Viscometric titration of the effects of spermine concentration on native (○) and denatured (◻) DNA at 26°C. The concentration of the both conformation species of DNA was  $1.73 \times 10^{-4} M$  nucleotide phosphorus.

시키는 효과 못지 않게 spermine 이 narrow groove 를 橫斷하여 spermine 의 charged amino groups 및 NH groups 와 DNA strand 의 phosphate oxygen atoms 와의 electrostatic 및 水素結合들에 의한 cross-link 에 의한 효과가 중요함을 本 研究에서 豫想할 수 있으며 이러한 觀點은 Glasser 및 Gabbay<sup>21</sup> 의 것과 부합된다고 볼 수 있다. 特히 本 研究의 data 를 基礎로 하는 重要的 着眼點은 축합과정에 그에 따라 誘發되는 DNA 構造의 cooperative transition 이 重要的 役割을 한다는 새로운 見解이다.

이러한 構造 變移의 特性을 더욱 究明하기 위하여 spermine 의 存在 및 不在時 溫度 增加에 따른 260nm 에서의 absorbance 및 粘性度의 變化를 測定 比較하였다. Fig. 6에서 보는 바와같이  $3 \times 10^{-4} M$  spermine 이 存在할 경우 DNA 의 melting 이 始作되기 前에 下方向으로 吸光度 減小에 基因하는 trough 를 갖는 anomalous absorbance profile 이 얻어진다. 同一한 條件下에서 溫度 增加에 따른 粘性度의 變化를 보여 주는 Fig. 7에서 이 trough profile 이 이루어지는 溫度 영역에서 스페르민이 存在할 경우에는 그 粘性도가 spermine 이 存在 안 할 경우 보다 溫度 增加에 따라 더욱 낮아짐을 알 수 있다. 이와 같은 傾向은 denatured DNA 의 경우에는 觀察되지 않는다.

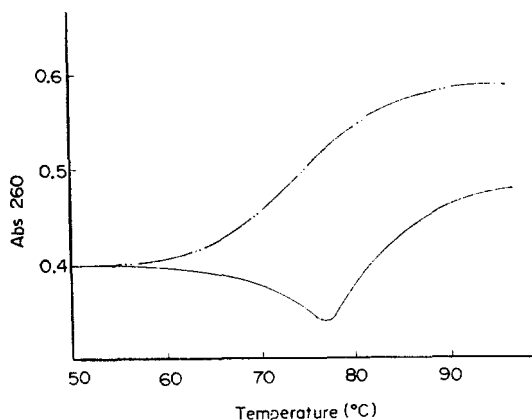


Fig. 6. Anomalous absorbance-temperature profiles of DNA. The concentration of spermine and the DNA was  $3 \times 10^{-4} M$  and  $6.1 \times 10^{-6} M$  nucleotide phosphorus respectively. ---: Minus spermine. —: Plus spermine.

따라서 이러한 anomalous absorbance-temperature 및 viscosity-temperature profiles 는 spermine 存在時 溫度 增加에 따른 monomolecularly condensed structure 의 安定化를 나타내는 것이라고 볼 수 있을 것이다. 이러한 생각을 基礎로 하고 또 two-state transition 을 假定하여 이 anomalous absorbance-temperature profile 로 부터 溫度 增加에 따른 安定化된 condensed structure 의 形成에 對한 enthalpy 變化 및  $n$  (cooperative length) 를 계산한 값들과 그 값들에 미치는 ethidium bromide ( $2.8 \times 10^{-6} M$ ) 의 影響을 Table 2에서 보여 준다. 이 表에서 heat-stabilized condensed structure 의 形成은 cooperative process 이며 EtBr 에 의하여 그 cooperativity 가 減小됨을 볼 수 있다.

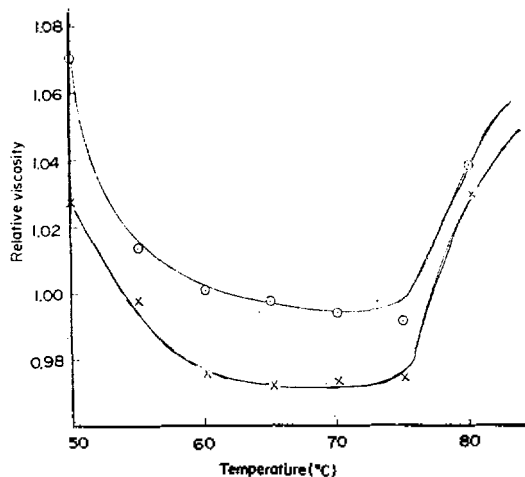


Fig. 7. Relative viscosity profiles of the DNA under the conditions corresponding to those of the anomalous melting profiles of the DNA (Fig. 6). O: Minus spermine. X: Plus spermine.

Table 2. Data of the transition in the heat-stabilization of the condensed DNA structure, based on the anomalous absorbance-temperature profile of the DNA

| Conc. of spermine (M) | Conc. of EtBr (M)    | Tc (°C) | $\Delta H$ (kcal/mol) | Ratio of $n$ |
|-----------------------|----------------------|---------|-----------------------|--------------|
| $3 \times 10^{-4}$    | 0                    | 74      | -319.3                | 2.8          |
| $3 \times 10^{-4}$    | $2.8 \times 10^{-6}$ | 57      | -125.54               | 1.0          |

Tc: Transition midpoint

### 考 察

本 研究 結果 spermine 에 의한 송아지 胸線 DNA 의 compact form 으로의 condensation 은 cooperative process 일 것이라는 것을 알 수 있고 이와 對照的으로 secondary structure 가 결핍되는 denatured DNA 는 spermine 에 의하여 이러한 monomolecular collapsed form 을 이루기 보다는 오히려 DNA 와 DNA 의 分子間 cross-link 에 의한 intermolecular aggregate 를 形成함을 알 수 있으며, 따라서 DNA 의 spermine 에 의한 monomolecular condensation 은 構造的으로 對稱的인 spermine 과 DNA 와의 對稱의 共通의인 軸을 따라서의 相互作用 即 spermine 分子가 DNA double helix 의 minor groove 內로 結合하여 들어 감이 重要함을 알 수 있다. Double helix 構造가 결핍되어 있으므로 spermine 과 이와같은 相互作用을 할 수 없는 denatured DNA 는 spermine 에 의하여 이루어지는 DNA 의 이와 같은 monomolecular condensation form 보다는 intermolecular aggregate 를 形成한다는 實驗的 事實은 이와 같은 생각을 뒷받침하여 준다.

本 研究에서는 spermine 에 의한 DNA 의 monomolecular condensation 過程에 있어서의 構造變移의 特性을 알아내기 위한 間接的 indicator 로서 ethidium 의 DNA 와의 binding 特性을 調査하였다.

Spermine 濃度 增加에 따른 DNA viscosity 減小가 cooperative 過程이며 DNA 의 한 部位에 結合된 spermine 이 allosteric transmission 效果에 의하여 立體的으로 떨어져 있는 spermine-free DNA 部位의 ethidium 結合에 對한 allosteric 效果를 갖는다는 本 實驗 結果와 一般적으로 이러한 allosteric transmission 이 '結合된 drugs 에 의한 全體 DNA 構造 變移의 誘發에 基因한다는 事實들로부터<sup>23-25</sup> spermine 에 의한 DNA 의 monomolecular condensation 過程은 allosteric effect 의 transmission 이 관여하는 cooperative 過程일 것이라는 結論을 얻을 수 있을 것이다.

Ordered double helical 構造를 갖는 native DNA 는 spermine 이 그 minor groove 에 架橋結

합함으로써 誘發되는 allosteric 效果의 transmission 이 可能하며, 따라서 monomolecular condensation 이 cooperative 過程으로 일어날 수 있으나 ordered double helical 構造가 결핍되어 spermine 에 의한 架橋結合 形成, 따라서 spermine 에 의한 이러한 構造 變移 傳達이 不可能한 denatured DNA 는 monomolecular condensation 이 어려울 것이라고 推理될 수 있을 것이다.

不過 10% 미만의 nucleotide phosphorus 만이 spermine 分子와 직접 접촉하고 있으며, DNA 의 약 90% 이상이 spermine-free 상태로 남아 있는 경우에도 結合된 spermine 이 자기가 結合하는 자리 以外의 全體 DNA 構造에 影響을 미칠 수 있으며 monomolecular condensation 을 誘發시킬 수 있음을 보여주는 本 研究 data 는 낮은 濃度の spermine 이 Escherichia coli chromosome 構造의 intactness 를 保持함이 重要하다는 前의 다른 報告<sup>20</sup> 뿐 만 아니라 DNA 의 compact packaged tertiary structure 를 形成함에 重要한 flexibility 또는 bending 이 polynucleotide backbone 의 rotation angles 의 작은 perturbation 에 의하여 生成된다는 一般의 見解와 聯關시켜 考察할 때 興味롭다. Spermine 이 DNA 의 narrow groove 에 架橋結合할 때 DNA backbone 의 rotation angles 에 작으나마 그러한 perturbation 이 일어날 수 있는 可能性을 排除할 수 없고 단일 spermine 에 의하여 helix 內에 kinks 가 規則的 간격으로 생길 때에는 DNA 의 superhelical 構造가 얻어질 수 있을 것이다. Spermine 의 存在下 ethidium 의 DNA 와의 affinity 가 減小하는 本 研究 data 는 이와 같은 豫想에 부합된다.

本 研究에서 ethidium 은 spermine 이 存在하지 않을 경우에는 DNA 와 negative cooperative binding 을 하지만 spermine 이 存在할 경우에는 그 cooperativity 가 增加됨을 觀察하였다. ethidium 은 DNA 와 negative-cooperative neighbor binding(excluded-site model)에<sup>26</sup> 의하여 intercalative binding 을 함으로써 DNA helix 의 angular winding 을 일으킴이 알려져 있다<sup>27</sup>.

Spermine 에 의한 DNA 의 superhelical 構造形成은 ethidium 에 의한 이러한 angular winding

및 negative-cooperative-neighbor binding에 대하여 抵抗的 效果를 가져 올 것이며, spermine에 의한 ethidium의 DNA와의 negative cooperative性質이 없어짐은 이러한豫想에 부합된다.

結論的으로 spermine은 DNA의 compact構造의 collapse에 DNA사슬의 linear negative charge를 中和시킴으로써 사슬간의 反變的 相互作用을 排除시키며 double helix의 narrow groove에 架橋的 結合을 形成함으로써 allosteric effects의 transmission에 의하여 DNA全體의 構造에 影響을 미침으로써 cooperative process에 의한 DNA의 compact構造로의 condensation을 誘發시킨다고 생각할 수 있을 것이다.

Spermine에 의한 DNA condensation에 double helical structure의 存在가 要求된다는 本 研究 data의 生物學的 意義는 遺傳因子 發顯 調節의 效率的 調節 機構와 有關하다고 생각된다. DNA의 遺傳因子가 double helical構造를 保持하여 不活性인 경우에는 spermine에 의한 compact構造를 쉽게 이룰 수 있음으로써 closed構造를 維持할 수 있으나 DNA의 遺傳因子가 發顯되기 爲하여 double helical structure가 풀려서 open構造가 이루어 질 경우에는 spermine에 의한 compact構造 形成이 이루어 지지 않음으로써 遺傳因子 發顯 調節이 效率的으로 이루어 질 수 있는 可能性을 期待하여 볼 수 있으며, 또한 이러한 遺傳因子의 機能的 構造 變移가 cooperative하게 일어 남으로써 遺傳因子의 發顯 調節이 더욱 效率的으로 이루어 질 수 있는 機構를 생각해 볼 수 있을 것이다.

本 研究는 韓國科學財團의 研究費 支援에 의하여 이루어졌으며 이에 對하여 感謝드립니다.

#### 인용문헌

1. S. S. Cohen, "Introduction to the Polyamines," Prentice-Hall, New Jersey, 1971.
2. C. W. Tabor, H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, **45** 285 (1976).
3. A. Raina, M. Jansen and S. S. Cohen, *J. Bacteriol.*, **94**, 1684 (1976).
4. B. Ganem, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 290 (1982).
5. M. Suwalsky, W. Traub, V. Shmueli and J. Subirana, *J. Mol. Biol.*, **42**, 363 (1969).
6. B. N. Ames and D. T. Dubin, *J. Biol. Chem.*, **235**, 769 (1960).
7. D. Kaiser, M. Syvaen and T. Masuda, *J. Mol. Biol.*, **91**, 175 (1975).
8. U. K. Laemmli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4288 (1975).
9. L. Gosule and J. A. Schellman, *Nature*, **259**, 333 (1976).
10. D. K. Chatteraj, L. C. Gosule and J. A. Schellman, *J. Mol. Biol.* **121**, 327 (1978).
11. L. C. Gosule, D. K. Chatteraj and J. A. Schellman, "Advances in Polyamine Research," Vol. 1, p. 201. R. A. Campbell, et al., Ed., Raven Press, New York, U.S.A., 1978.
12. R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, **18**, 2192 (1978).
13. T. J. Thomas and V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **22**, 1097 (1983).
14. J. A. Subirana and J. L. Vives, *Biopolymers*, **20**, 2281 (1981).
15. G. S. Manning, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978).
16. L. S. Lerman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 59 (1973).
17. C. W. Tabor and S. M. Rosenthal, "Methods in Enzymology," Vol. VI, P. 619. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Ed., Academic Press, New York, U.S.A., 1963.
18. Thong-Sung Ko, Joon Huh, Pyung Keun Myung and Mun Kyeu Park, *Chungnam J. Sci.*, **9**, 59 (1982).
19. M. Tsuboi, *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **37**, 1514 (1964).
20. I. Flink, D. E. Pettijohn, *Nature*, **253**, 62 (1975).
21. R. Glasser and E. J. Gabbay, *Biopolymers*, **6**, 243 (1968).
22. Thong-Sung Ko, Joon Huh, Pyung-Keun Myung and Young Cho, *J. Korean Chem. Soc.* **26**, 247 (1982).
23. F. Pohl, T. M. Jovin, W. Baehn and J. J. Holbrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**,



- 3805 (1972).
24. J. F. Burd, R. M. Wartell, J. B. Dodgson and R. D. Wells, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5109(1975).
25. M. Hogan, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Nature*, **278**, 521 (1979).
26. D. M. Crothers, *Biopolymers*, **6**, 575 (1968).
27. H. M. Sobell, *Annu. Rev. Biochem.*, **5**, 307 (1976).