

Nucleohistone 과 DNase 1 과의 相互作用의 Cooperativity 및 이에 미치는 Spermine 과 Dansylation 効果

李璫容 · 高東成[†]

忠南大學校 理科學 化學科

(1985. 1. 22 접수)

Cooperativity of the Interaction of Nucleohistone and DNase 1, and Effects of Spermine and Dansylation on It

Chan Yong Lee and Thong-Sung Ko[†]

Department of Chemistry, College of Sciences Chungnam National

University, Dae Jeon 300-31, Korea

(Received January 22, 1985)

요 약. 송아지 흉선 nucleohistone 의 DNase 1 에 對한 susceptibility 와 相互作用의 cooperativity 에 미치는 spermine 의 效果를 nucleohistone 의 構造變移와 關聯시켜 調查하였다. 이들 data 로 부터 nucleohistone 은 遊離 DNA 와는 對照的으로 spermine 에 의하여 monomolecular condensation 을 일으키지 않고 intermolecular aggregation 을 이루며 nucleohistone 의 DNase 1 과의 相互作用 cooperativity 가 spermine 에 의하여 增加됨을 推理할 수 있다.

Nucleohistone 의 histone 部分의 cooperativity 에 關한 機能的 役割을 究明하기 위하여 histone 部分을 單立化시킨 DNS-nucleohistone 을 製造하여 DNase 1 과의 相互作用을 調查하여 보았는바 negative cooperativity 로 나타났다. 이로 부터 nucleohistone 의 histone 部分은 nucleohistone 의 cooperativity 에 影響을 미치리라고 推理할 수 있다.

ABSTRACT. Effect of spermine on the susceptibility of calf thymus nucleohistone to DNase 1, in relation to the structural change of the nucleohistone, and cooperativity of the interaction of the nucleohistone with DNase 1 was investigated. Dansylated nucleohistone, in which the histone moiety had been derivatized by dansylation, was also used to investigate functional roles of the histone moiety on the cooperativity. The data here indicate the possibility that the nucleohistone, in contrast with the DNA, may not undergo monomolecular condensation, whereas intermolecular aggregation and enhancement of the positive cooperativity of the interaction of nucleohistone with DNase 1 may be brought about by spermine. The interaction of the DNS-nucleohistone with DNase 1 showed negative cooperativity. Based on the data here, it can be speculated that the cooperativity of the nucleohistone is influenced by the histone moiety of the nucleohistone.

序 論

著자들은 前에 遺傳因자의 機能, 調節 및 多形性에 대한 중요한 기초 메카니즘이 될 수 있는 遺傳因자의 ligand 에 의한 協同的(coopera-

tive) 構造變移에 대한 研究의 一環으로서 송아지 흉선 DNA 자체의 삼차원적 構造變移에 미치는 spermine 의 影響을 研究하였다.¹⁻⁵ 本 研究에서는 이러한 研究를 보다 고차원적 구조를 갖는 송아지 흉선 뉴클레오히스톤(nucleohistone)으로

확장시켜 nucleohistone 의 DNase 1 에 대한 susceptibility, viscosity, DNase 1 과의 相互作用에 대한 cooperativity 에 미치는 spermine 의 影響을 探究함으로써 nucleohistone 의 機能的 構造變移 (functional structural transition) 및 이에 미치는 spermine 의 影響과 더불어 nucleohistone 의 histone moiety 의 效果를 探究하였다. 특히 histone moiety 의 影響에 관한 研究에는 nucleosome 에 대한 DNase 1 의 加水分解作用에 대한 論文들이 가끔 發表되고 있으나⁶ 그 機能的 構造變移의 協同性에 대한 것은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 이러한 解明은 遺傳因자의 機能, 調節 및 多形性 등의 解明에 重要한 基礎原理가 될 것이다.

實驗方法 및 材料

송아지 흉선 DNA (calf thymus DNA, type I), 송아지 흉선 nucleohistone, deoxyribonuclease 1 (DNase 1, DN-100) 및 spermine tetrahydrochloride 는 모두 미국 Sigma Chemical Company 로부터 購入하였으며 dansyl chloride (DNSCl, TCI-GR) 는 Tokyo Kasei 로부터 購入하였다.

熱變性 DNA 는 波長 260nm 에서의 吸光度가 1.6이 되는 DNA 수용액을 끓는 물 속에서 20 분간 加熱한 후 얼음 물에서 急冷却시켜서 製造하였다.

粘性度 測定에 사용된 緩衝溶液은 0.005 M NaCl, 0.03 M MgCl₂, 0.008 M acetate 로 構成된 acetate buffer pH 7 (standard acetate buffer) 이며 nucleohistone 의 경우에는 0.03 M MgCl₂ 및 1 M NaCl 을 含有하는 0.008 M acetate buffer pH 7 이었다.

分光學的 測定 實驗은 常溫에서 Pye Unicam SP1800 Spectrophotometer 를 使用하여 遂行하였다. DNA 構造變移에 따른 DNA 의 DNase 1 에 대한 susceptibility 實驗과 粘性度 測定 實驗에 사용한 standard acetate buffer 를 本 實驗에 사용하였으며 필요에 따라서 spermine 적당량을 吸光度 測定 直前に DNA 용액에 가하여 주었다.

Nucleohistone 의 단실화 (dansylation). 1 M NaCl 을 含有하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 40ml 에 5 mg nucleohistone 을 넣어주고 하

룻밤 찬 곳(4°C)에 저장한 후 짓개로 지어주어 溶解시킨 다음 前に 發表된 蛋白質 단실化 方法⁷ 에 따라서 10mg/ml 濃度の dansyl chloride acetone 溶液 0.8 ml 을 그 찬 곳에서 加하여 주고 4 時間동안 계속하여 지어줌으로써 nucleohistone 을 DNS-nucleohistone (dansylated nucleohistone) 으로 단실화시켰다. 단실化 反應 過程 終了後 1 M NaCl 을 含有하는 0.01 M acetate buffer pH 7 에 대하여 exhaustive dialysis 를 시켜서 未反應狀態로 남아있는 DNSCl 을 除去시켰다. 단실化된 程度는 最大吸收波長인 310nm 의 吸光度로부터 extinction coefficient $4 \times 10^6 \text{cm}^2/\text{g} \cdot \text{mole}$ 을 基準으로 하여¹¹ 計算하였다. Nucleohistone 溶液에 DNSCl 의 acetone 溶液 대신 acetone 을 加하여 주고 DNS-nucleohistone 製造 過程과 同一한 過程을 밟은 nucleohistone 溶液을 製造하여 이것을 DNS-nucleohistone 의 reference 로서 사용하였다.

DNA 의 DNase 1 에 대한 Susceptibility 測定. DNase 1 의 活性度 測定 實驗은 加水分解 結果 遊離되는 acid-soluble hydrolyzate supernatant 의 260nm 에서의 紫外吸光度 測定 方法을 使用하였다.⁸ DNase 溶液은 5mg DNase 를 사용 직전에 3.5ml 의 冷却된 0.15M NaCl 溶液에 녹였으며 基質의 水溶液은 前に 報告된 바와 같이 만들었다.² 反應混合物 緩衝溶液의 最終 組成은 0.03 M MgCl₂, 0.005 M NaCl 및 0.008 M acetate, pH 5.0 이었다. 25°C 에서 preincubation 된 基質溶液 1.9 ml 과 DNase 溶液 0.1 ml 을 섞어주어 25°C 에서 20分間 反應시킨 후 0.1% BSA 溶液 0.1 ml, 이어 trichloroacetic acid 대신 perchloric acid 를 含有하는 modified MacFadyen's reagent^{8,9} 2ml 을 加하여 주고 前に 報告된 過程² 을 遂行하였다.

Nucleohistone 및 DNS-Nucleohistone 의 DNase 1 에 대한 Susceptibility 測定 : 1 M NaCl 을 含有하는 0.01 M acetate buffer, pH 7 에 녹은 nucleohistone 溶液을 nucleohistone 基質의 stock 溶液으로 사용하였다. DNase 1 에 대한 susceptibility 測定 實驗은 最終 反應混合物의 緩衝溶液 成分의 한가지인 NaCl 組成을 0.005 M 대신

0.5 M 로 增加시켜준 것 이외는 DNA 의 DNase 1 에 대한 susceptibility 測定 實驗의 경우와 同一하다.

結果 및 考察

Nucleohistone 의 Dansylation. Nucleohistone 의 단실化 反應液을 反應 後 exhaustive dialysis 等의 方法으로 結合되지 않은 遊離 DNS 分子들을 除去시킬 경우 DNS(dansyl) group 은 DNA 와 反應하지 않고 選擇적으로 histone 蛋白質과만 反應하리라는 것은 ribosome 을 單실化 시킬 경우 DNS group 이 RNA 와는 反應하지 않고 ribosomal protein 과만 選擇적으로 反應한다는 研究結果¹⁰로 부터 豫測할 수 있다. 製造된 DNS-nucleohistone 의 absorption spectrum 은 Fig. 1 에서 보는 바와 같이 310nm 에서 maximum absorption 을 가진다. Histone 分子當 結合된 DNS group 의 數는 蛋白質에 대한 Weber 의 方法¹¹에 따라서 最大吸光波長 310nm 에 대한 $4.3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{g} \cdot \text{mole}$ 의 extinction coefficient 로 부터 計算한 histone 分子當 結合된 DNS group 의 數는

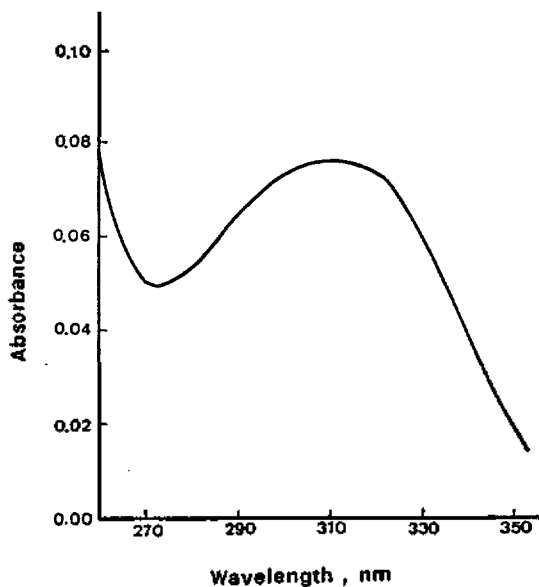


Fig. 1. Absorption spectrum of the dansylated nucleohistone scanned by Pye Unicam SP 1800. Undansylated nucleohistone solution of the same concentration was used as the blank. Detailed information on the samples [are described in the text.

약 7 이었다. 이때 蛋白質의 濃度는 histone 의 平均分子량을 16,000으로¹² 가정하였다. 蛋白質의 濃度는 紫外吸光度 data ($A_{260}=1.380$, $A_{280}=0.954$)로 부터 Warburg 및 Christian 의 方法¹³으로 구하였으며 0.0362mg/ml 이었다. 紫外吸光度 data 로 부터 計算한 nucleohistone 內 DNA 의 組成은 약 10% 이었다. DNS-nucleohistone 의 最大吸光波長 310nm 에서의 吸光度는 單실化 안된 nucleohistone 을 reference 로 하여 測定하였으며 그 값이 0.064 cm^{-1} 이었다.

以上과 같은 特性을 갖는 製造된 DNS-nucleohistone 과 單실化 되지 않은 nucleohistone 을 써서 DNA 의 機能的 構造에 대한 研究結果를 相互 比較함으로써 nucleohistone 에서 DNA 와 結合하고 있는 histone 이 DNA 의 機能的 構造變移에 미치는 影響을 調査하였다.

Nucleohistone 의 構造變移에 미치는 Spermine 의 影響. Spermine 이 nucleohistone 의 viscosity 에 미치는 影響을 보여주는 Fig. 2 는 free

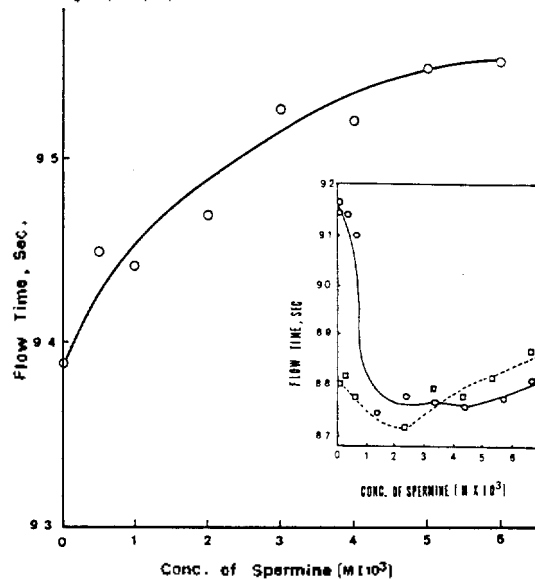


Fig. 2. Effect of Spermine concentration on the viscosity of nucleohistone in the standard acetate buffer at 25°C. The values of viscosity are expressed by flow time(sec.). The concentration of nucleohistone was 0.0125mg/ml. The inserted figure, which shows the data of the viscometric titration of the free calf thymus DNA with spermine, is the data from Ref. 3. (○; ○: native DNA; □: denatured DNA).

DNA 의 경우를 보여주는 삽입된 그림과는 對照的으로 spermine 濃度가 낮은 영역에서의 monomolecular condensation phase 를 갖지 않지만 spermine 濃度 增加에 따라서 denatured DNA 와 같이 viscosity 가 增加됨을 알 수 있다. 따라서 細胞內 histone 등과 結合을 이루고 있는 eukaryotic DNA 는 bacteriophage DNA 와는 달리 spermine 에 의하여 monomolecular condensation 을 일으켜 compact 構造를 이루지 않을 것이라고 豫測할 수 있을 것이다. 그러나 histone 등과 遊離되는 어떠한 細胞分裂 過程 phase 에서는 bacteriophage DNA 의 경우와 類似하게 spermine 에 의하여 monomolecular condensation 에 의한 compact 構造를 순간적으로 이룰 수 있을 것이다.

Nucleohistone 의 DNase 1 에 대한 susceptibility 에 미치는 spermine 의 影響. Spermine 이 存在할 경우 ($5 \times 10^{-3}M$)와 存在하지 않을 경우 基質 濃度 變化에 따른 nucleohistone 의 DNase 1 에 대한 susceptibility 의 變化를 보여주는

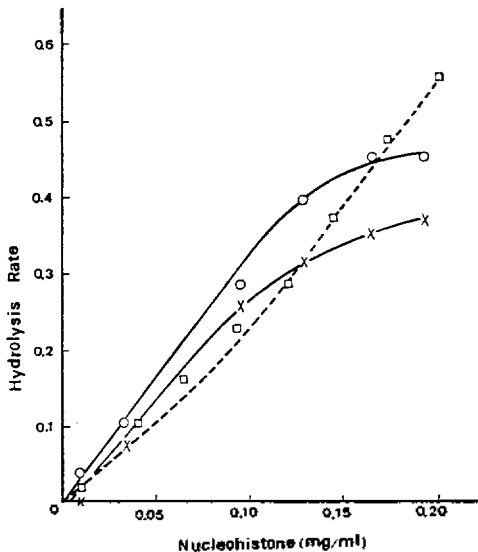


Fig. 3. Dependence of susceptibility of nucleohistone species for DNase 1 in the presence ($5 \times 10^{-3}M$) and absence of spermine on the concentration of the respective substrate concentration. Absorbance increase at 260nm per 30min. incubation at 25°C is expressed as "hydrolysis rate". ×: nucleohistone, plus spermine. ○: nucleohistone, minus spermine □: DNS-nucleohistone

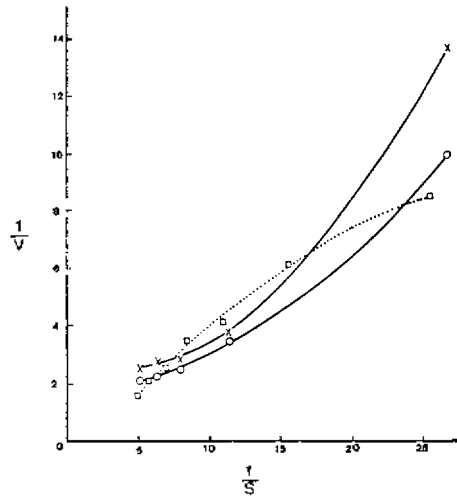


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the data of Fig. 3. ×: nucleohistone, plus spermine. ○: nucleohistone, minus spermine. □: DNS-nucleohistone

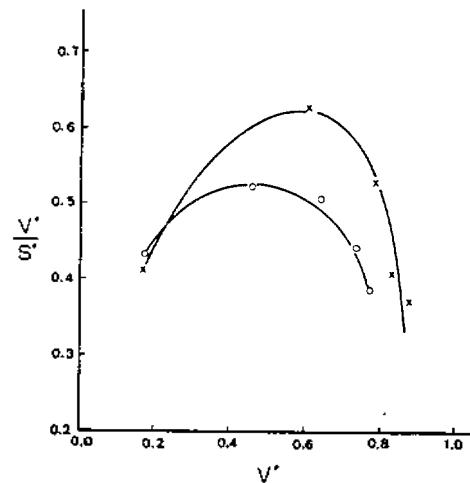


Fig. 5. Eadie-Scatchard plot of the data of nucleohistone from Fig. 3. ×: Plus spermine. ○: Minus spermine.

Table 1. Kinetic characteristics of the interaction of nucleohistone with DNase 1 in the presence ($5 \times 10^{-3}M$) and absence of spermine

	n_{app} (Hill coefficient)	$K' ([S]_{0.5})$	V_{max}
Nucleohistone, plus spermine	2.08	0.81	0.434
Nucleohistone, minus spermine	1.80	0.96	0.625

Fig. 3에서 spermine은 nucleohistone의 DNase 1에 대한 susceptibility를 억제시킴을 볼 수 있으며 Fig. 3의 Lineweaver-Burk plot(Fig. 4) 및 Eadie-Scatchard plot(Fig. 5)로부터 계산되는 두 경우에 대한 V_{max} 및 $K'((s)_{0.5})$ 의 값들(Table 1)을 비교하여 보면 spermine이 존재할 경우가 존재하지 않을 경우 보다 V_{max} 와 $K'((s)_{0.5})$ 이 각각 31% 및 16% 감소됨을 알 수 있다.

이와같은 spermine의 nucleohistone의 DNase 1에 대한 susceptibility 억제 효과는 spermine의 nucleohistone 粘性度 增加 효과와 연관시킬 경우 spermine의 nucleohistone 分子間 凝集 増進 효과에 基因한다고 생각된다.

Histone 부분이 nucleohistone의 構造 및 DNase 1 susceptibility에 대한 協同的 性質에 미치는 影響. 위에서 관찰한 nucleohistone의 DNA와의 성질들의 차이는 DNA와 結合된 histone의 影響 때문이라 推測되는 바 이에 대한 정보를 얻기 위하여 製成된 DNS-nucleohistone과 reference nucleohistone을 粘性度(Fig. 6)와 susceptibility(Fig. 3)에 있어서 比較하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 nucleohistone內 histone이 單體化됨에 따라서 그 粘性도가 커짐을

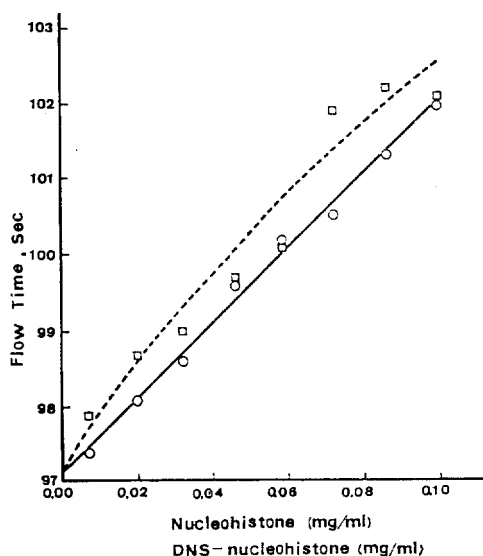


Fig. 6. Viscosity expressed by flow time (sec.) vs. nucleohistone concentration ○: nucleohistone. □: DNS-nucleohistone

볼 수 있으며 따라서 單體化에 의하여 nucleohistone 構造가 攪亂(perturb)되었음을 豫測할 수 있다. 單體化에 의한 nucleohistone의 이러한 構造 攪亂은 nucleohistone의 compact 구조 유지에 중요한 역할을 하는 lysine의 陽荷電(positive charge)이 單體化에 의하여 除去된 때문이라고 해석된다. 前에 報告된 바에 의하면¹⁴ 송아지 糞 선 chromatin內 lysine들의 90%까지 lysine 陽荷電을 유지시킨 채로 ethyl acetimidate와 反應시킬 경우 histone H₁ 結合이 느슨하여지는 것 이외에 그 chromatin 構造가 攪亂되지 않음이 관찰되었다고 한다. 따라서 nucleohistone의 構造에 重要한 影響을 미치는 것은 lysine의 荷電이 立體的으로 嚴密한 보완관계가 아님을 예상할 수 있다.

前에 著者들은⁴ 이미 송아지 糞 선 DNA에 있어서 DNA의 한 部位에 結合된 spermine이 그 結果 誘發되는 삼차원적 構造變移의 allosteric 波及效果에 의하여 그 DNA의 spermine-free 部位의 cooperative conformation 特性을 變化시켜 준다는 結果를 얻은 바 있다. DNA의 이러한 allosteric 效果를 더욱 探究하고 DNA가 蛋白質等과 結合된 보다 더 고도로 복잡한 system이 될 때면 nucleohistone 등으로 이와 같은 allosteric 效果에 대한 研究를 發展시켜 나가는 것이 重要할 것이다. nucleohistone의 이 방면에 대한 研究 model system으로서의 nucleohistone의 DNase 1과의 相互作用 즉 nucleohistone內 DNA의 DNase 1에 대한 加水分解反應 system을 택하여 spermine이 nucleohistone-DNase 1 酵素作用에 미치는 影響을 調査하고, DNA와 結合하고 있어서 DNA의 構造 機能에 重要한 역할을 하는 histone 蛋白質들의 DNA의 allosteric 성질에 미치는 影響을 알아내기 위하여 DNS-nucleohistone과 單體化 안된 reference nucleohistone에 대한 比較 實驗을 遂行하였다. Nucleoprotein의 構造 機能에 관한 研究는 많이 發表되고 있으나⁶ 本 研究에서와 같은 allosteric 性質에 관한 研究는 별로 行하여 지지 못하고 있는 실정이다.

Nucleohistone의 分子量을 10⁶ 정도의 等位(order)로 볼지라도 DNase 1의 分子量이 31,000

으로 報告되고 있으므로¹² 基質인 DNA 의 크기 가 酵素인 DNase 1 의 크기 보다 10^5 배나 더 되고 DNA 가 酵素에 對한 多數(multiple) 결합자리(binding sites)를 가지고 있음이 예상되며 DNA 上의 이들 酵素 결합자리들이 獨立的(independent)이 아니고 相互依存的(interdependent)인 경우에는 DNA 는 DNase 1 結合에 대하여 conformational transition 에 의한 cooperativity (allosteric 性質)를 나타낼 것이며 이러한 allosteric 性質에 histone 蛋白質 및 기타 要素들이 影響을 미침으로써 nucleosome chromation 等の 構造 機能 性質에 重要한 影響을 미칠 것임을 예상할 수 있다. 따라서 本 研究에서는 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 DNase 1 에 대한 nucleohistone 의 susceptibility 에 미치는 단실化의 影響을 調査하였다.

Nucleohistone 과 DNase 1 相互作用의 協同性(cooperativity) 및 이에 미치는 spermine 과 단실化 效果. 이들 nucleohistone 들의 DNase 1 에 대한 酵素學의 特性을 더욱 자세하게 알기 위하여 Fig. 3의 data 를 Lineweaver-Burk plot 을 한 結果 Fig. 4 에 보여주는 바와 같이 nucleohistone 은 spermine 이 存在할 때와 안 할때 共히

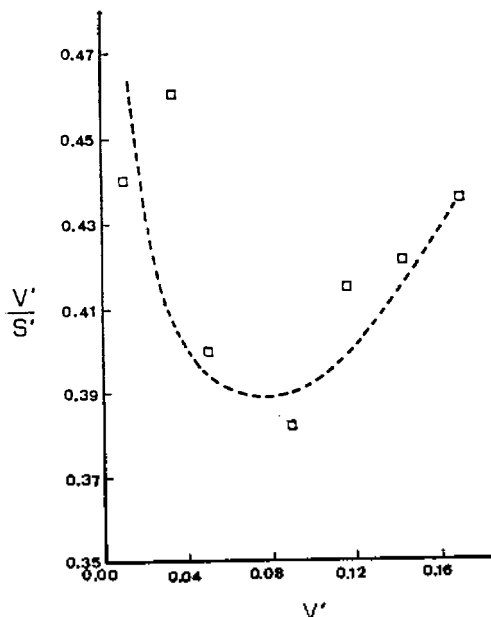


Fig. 7. Eadie-Scatchard Plot of the data of DNS-nucleohistone from Fig. 3.

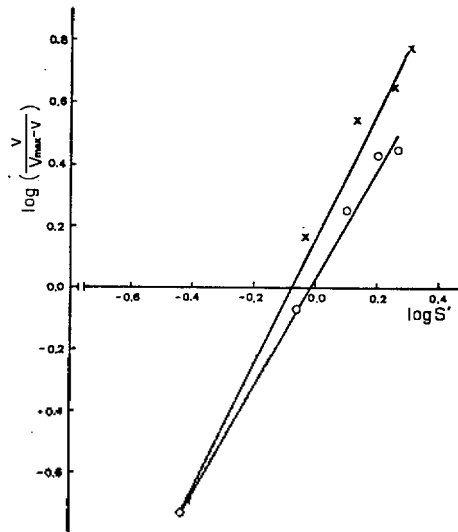


Fig. 8. Hill plot of the data of nucleohistone from Fig. 3. ×: Plus spermine. ○: Minus spermine.

線形(linearity)에서 벗어나고 concave upward double reciprocal 을 가져 陽의 協同性(positive cooperativity)을 갖지만 DNS-nucleohistone 의 경우에는 반대로 concave downward double reciprocal 을 가져 陰의 協同性(negativity cooperativity)을 가짐을 볼 수 있다. 이러한 cooperativity 를 明確하게 確認하기 위한 Eadie-Scatchard plot 및 Hill plot 을 Fig. 5, Fig. 7 및 Fig. 8에서 보여준다. 이들 그림으로부터 계산한 Hill 係數, $K'((s)_{0.5}^n)$ 값들을 Table 1에 실었다. 이들 data 로 부터 nucleohistone 의 DNase 1 과의 相互作用은 陽의 協同性(positive cooperativity)으로 일어나며 spermine 은 이 positive cooperativity 를 增加시키는 效果를 가졌음을 알 수 있다. 반면에 단실化는 positive cooperativity 를 negative cooperativity 로 바꾸어 줌을 알 수 있다.

結論的으로 spermine 과 같은 ligand 및 nucleohistone 의 histone 은 nucleohistone 의 cooperativity (allosteric 性質)에 重大한 影響을 미치리라는 것을 推理할 수 있다. 著者들은 前에 이미 DNA 의 構造變移에 대한 allosteric 波及效果를 관찰 연구한 바 있다. 이 경우 DNA 는 monomeric system 에 있어서의 allosteric 轉移(transi-

tion)이며 더 높은 차원의 構造的 複雜性을 지니고 subunit로 構成된 chromosome에 있어서는 subunit cooperativity가 이루어질 경우 monomeric system의 경우 보다 機能的(functional) 또는 調節(regulatory) 效率이 커질 수 있을 것이다. 즉 이러한 allosteric 效果는 遺傳因子的 機能 發顯, 調節 및 多形性에 重要な 役割을 할 것이다.

本 論文은 部分的으로 文教部 基礎科學 特性化 分野 學術研究助成費에 依하여 研究되었음.

引用 文 獻

1. Thong-Sung Ko, Joon Huh, Pyung Keun Myung, and Young Cho, *J. Korean Chem. Soc.*, **26**(4), 247 (1982).
2. Thong-Sung Ko, Joon Huh, Chun Bae Lee, and Moon Kyeu Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **27**(6), 429 (1983).
3. Thong-Sung Ko and Joon Huh, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**(1), 70 (1984).
4. Thong-Sung Ko, Joon Huh, and Chan Yong Lee, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**(3), 185 (1984).
5. Thong-Sung Ko, ChunBae Lee, and Pyung Keun Myung, *Report Res. Inst. Phys. Chem.*, Chungnam Natl. Univ., **5**, 12 (1984).
6. J.D. McGhree and G. Felsenfeld, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 1115 (1980).
7. D. J. R. Laurence, "Methods in Enzymology", Vol IV, P.211, S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Ed, Academic Press, New York, U. S. A., 1955.
8. M.R. McDonald, "Methods in Enzymology", Vol. II, P.427, S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Ed., Academic Press, New York, U. S. A., 1955.
9. D. A. Mac Fadyen, *J. Biol. Chem.*, **107**, 297 934).
10. Thong-Sung Ko, R. E. Adams, and L. B. Barnett, *Plant Sci. Lett.*, **2**, 225 (1974).
11. G. Weber, *Discussions Faraday Soc.*, **13**, 33 (1953).
12. P. L. P. Adams, R. H. Burdon, A. M. Campbell, D. P. Leader, and R. M. S. Smellic, "The Biochemistry of the Nucleic Acids", 9th Ed., p.154, Champman and Hall, New, York, 1981.
13. O. Warburg and W. Christian, *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1941).
14. L. O. Tack and R. J. Simpson, *Biochemistry*, **16**, 3746 (1977).