

可逆的 리간드 결합에 의하여誘發되는 DNA의 응축-풀립構造變移:  
Spermine-DNA 複合體의 異例的 吸光度-溫度  
樣相에 미치는 Urea의 影響

高東成<sup>†</sup> · 李樂容  
忠南大學校 理科學 化學科  
(1985. 5. 29 접수)

Condensation-Decondensation Structural Transition of DNA Induced  
by Reversible Ligand Binding : Effect of Urea on Anomalous  
Absorbance-Temperature Profile of Spermine-DNA Complex

Thong-Sung Ko<sup>†</sup> and Chan Yong Lee

Department of Chemistry, Chungnam National University, Dae Jeon 300-31, Korea

(Received May 29, 1985)

요약. Spermine에 의하여誘發되는 凝縮 DNA 構造의 安定化에 있어서 hydrophobic interaction의 重要性을 試驗하기 위하여 spermine-DNA 複合體의 異例的 吸光度-溫度 樣相에 미치는 urea의 效果를 調査하였다. 그 結果 異例的 吸光度-溫度 樣相의 downward peak (trough) 領域에 이르는 相變移에 對한 cooperativity, enthalpy, midpoint의 값들이  $T_m$  領域의 값들 보다 urea에 敏感한 影響을 받았으며, urea의 濃度 增加에 따라 downward peak가 점차 사라졌다. 이 data는 異例的 吸光度-溫度 樣相을 構成하는 downward peak가 spermine에 의하여誘發되는 hydrophobic interaction에 의한 凝縮된 tertiary structure의 形成을 나타내고 있다고 볼 수 있다.

**ABSTRACT.** To investigate the importance of the hydrophobic interaction in the spermine-induced collapse of DNA to a compact structure, the effect of urea on the anomalous absorbance-temperature profile of calf thymus DNA has been investigated. With the increase of the urea concentration, the trough phase of the anomalous absorbance-temperature profile was eliminated eventually. The cooperativity, enthalpy, and the midpoint of the transition to the trough region are more sensitive to urea than those of the  $T_m$ -region transition. The present data of the adverse effect of urea, a hydrophobic environmental reagent, on the thermal stabilization of the condensed state of DNA, suggest that hydrophobic interaction may play an important role in the stabilization of the tertiary structure of the collapsed state of DNA.

序 論

DNA는 큰 陰荷電 密度를 갖는 線型的 poly-electrolyte로서 DNA의 3次元的 構造 (conformation)는 環境에 敏感하다. DNA 構造의 安定化에 影響을 미칠 수 있는 環境的 要因으로는

salt (counterion) 濃度, pH, 溶媒등을 들 수 있다. 이러한 水溶液에서 DNA의 tri- 및 tetra-valent counterions에 의한, toroidal 構造에 의한 可逆的 凝縮에 對한 研究은 그 凝縮 메카니즘 自體 뿐만 아니라 virus들 및 chromosome들에 있어서 DNA의 packaging에 對한 model로

서도 중요하다. Counterion 농도의 증가는 대개 nucleic acid의 multistranded helical 구조들을 안정화 시키며<sup>2,3</sup>, 有機溶媒는 DNA의 double helix 구조를 안정화시키는 hydrophobic interaction을弱化시켜 DNA의 conformation을 불안정하게 한다<sup>4</sup>. 그러므로 counterion과 有機溶媒는 DNA 구조의 안정화에 相反의 效果를 지녔다 할 수 있으므로 DNA의 3次元의 構造變移에 對한 研究에 있어서 이들의 影響을 探究하는 것은 興味롭고 重要하다. 특히 여러가지의 counterion 중에서 生理的 pH에서 陽荷電으로 存在하는 polyamine類인 spermine은 polyanion인 DNA와 結合하여 DNA의 靜電氣의 反撥을 中和시킴으로써 生命體 內의 DNA majority가 compact form으로 存在케 하는 등 生體內에서 DNA의 構造-機能에 重大한 影響을 미치므로<sup>5-9</sup> spermine과 DNA와의 相互作用에 있어서 hydrophobic 環境을 組成하여 DNA의 3次元의 構造를 不安定화시키는 urea의 效果에 對한 探究는 DNA의 3次元의 構造變移에 對한 重要한 情報를 提供하여 줄 수 있을 것이다. 著者들은 前에 polyamine類인 spermine이 DNA의 3次元의 構造 (conformation) 變移에 미치는 一連의 研究들에서<sup>10-12</sup>, spermine 濃度  $3 \times 10^{-4} M$  附近에서 DNA는 最小粘度를 갖는 것으로 보아 spermine 濃度  $3 \times 10^{-4} M$  存在時 DNA는 單分子的 凝縮이 일어나므로 그 spermine 濃度 存在時의 異例의 吸光度-溫度 樣相의 downward peak (trough)의 生成은 溫度上昇에 의한 單分子的 凝縮된 構造의 增加 내지 安定화에 基因한다고 推理하였다.

그러므로 本 論文에서는 hydrophobic environmental reagent인 urea의 spermine-DNA complex의 異例의 吸光度-溫度 樣相의 相變移에 對한 transition enthalpy, cooperativity, 및 midpoint에 미치는 影響을 調査하였다. 또한 著者들은 前에 遂行한 研究에서<sup>12</sup> trough 部分 profile에 해당되는 相變移에 對한 構造變移를 갖는 3次元의 structural species는 spermine에 依하여 誘發되는 單分子的 凝縮된 構造에 이르며 溫度上昇에 依하여 有利하여지는 hydrophobic inter-

action에 依한 tertiary structure일 것이라고 推理하였던 바 本 研究의 이들 data는 이러한 推理를 支持하여 줌을 알아내고 그 뿐 만 아니라 本 研究 data는 urea, 즉 hydrophobic 環境의 試藥이 DNA의 3次元의 構造變移, 특히 凝縮된 構造에로의 붕괴에 미치는 效果의 解明에 對한 有用한 data가 됨으로써 DNA의 이러한 3次元의 構造變移 메카니즘의 解明에 도움이 될 것이다.

### 材料 및 實驗方法

Urea 및 송아지 胸腺 DNA (Type I)는 美國 Sigma Chemical Company로부터 購入하였으며 그 DNA 溶液은 0.008M citrate buffer pH 7.0에 녹여 만들었다. DNA의 濃도는 몰吸光係數  $\epsilon = 6600 M^{-1}$  DNA phosphate를 利用함으로써 260nm에서의 O.D. 값으로 決定하였다. 本 論文의 各 實驗에서 사용한 calf thymus DNA의 最終濃도는 그 DNA phosphate 濃도가  $6.1 \times 10^{-5} M$ 이 되도록 하였다. DNA 吸光度-溫度 樣相 試驗은 Pye Uncam SP1800 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 前에 이미 報告된 方法에<sup>12</sup> 따라서 遂行하였다. DNA 溶液에 spermine을 加할 경우에는 0.008M citrate buffer에 稀釋해서 DNA 溶液이 담겨진 試驗官의 器壁을 따라서 서서히 加하여 주면서 DNA 溶液을 잘 저어 주었으며 모든 試料溶液의 最終組成이 0.008M citrate, pH7.0 緩衝溶液이 되도록 하였다.

### 結果 및 考察

前에 報告된 여러가지 方法을 사용한 研究 data<sup>13-17</sup>에 의하면 DNA는 高度로 水化되어 있으며 이처럼 DNA와 相互作用하고 있는 물은 DNA의 secondary 및 tertiary 構造의 安定화에 적극적 參與를 하고 있을 것이다<sup>18</sup>. 따라서 DNA의 構造變移 및 特異한 三次元의 構造 安定화에 hydrophobic interactions가 重大한 役割을 하게 될 것이다. 그럼에도不拘하고 DNA의 凝縮된 構造에로의 崩壞(collapse) 및 凝縮構造의 安定화에 對한 研究에 있어서 主로 DNA의 陰荷電에 對한 cationic counterions 效果의 側面<sup>19-25</sup>에 단

偏重되고 hydrophobic interactions에 對한 研究가 別로 行하여지지 않고 있는 實情이라고 할 수 있다. 따라서 本 論文에서는 이에 對한 研究目的으로 疎水性 環境 試藥인 urea가 spermine에 의한 calf thymus DNA의 凝縮에 미치는 效果를 探究하였다. Urea는 잘 알려진 protein denaturant로서 hydrophobic interactions를 破壞한다. 著者들은<sup>12</sup> 前에 spermine에 의하여 誘發되는 DNA의 單分子的 凝縮 메카니즘을 考察하기 위하여 spermine 濃度 增加에 따른 DNA의 吸光度-溫度 樣相을 觀察한 結果 spermine 濃度가 增加함에 따라  $T_m$  값이 높아져 melting profile이 오른쪽으로 移動되다가 spermine 濃도가  $3 \times 10^{-4} M$ 에 이르면 이 現象들 이외에 melting이 如作되기 前에 溫度 上昇에 따른 吸光度 減少에 基因하여 생기는 downward peak (trough)가 生成되는 異例의 吸光度-溫度 樣相을 얻었다. 그러나 같은 spermine 濃度 條件에서 denatured DNA에서는 downward peak (trough)가 生成되지 않았으며 또한 두 隣接 base pairs 사이에 intercalate 됨으로써 DNA의 全體的 長이를 길게 만들어 주며 closed circular DNA의 풀림 效果를 가져오는 등 DNA 構造를 collapse시키는 spermine과 對照的 效果라 볼 수 있는 ethidium bromide  $2.8 \times 10^{-6} M$ 을 加하였을 때 그 downward peak (trough)는 소멸되었다. 즉 DNA가 單分子的 凝縮된 構造가 되는 데 있어서 障礙要因이 되는 DNA backbone phosphate의 큰 陰荷電 密度가 spermine과 같은 陽 ion에 의하여 充分히 작아져서 hydrophobic interaction에 의한 entropy-driven process에 의하여 自發적으로 凝縮이 일어날 수 있을 경우 이러한 過程은 溫度 上昇에 의하여 有利하므로 그 單分子的 凝縮된 構造의 增加 내지 安定화에 基因하여 downward peak (trough)가 生成되는 것을 推理할 수 있었다. 즉 trough 部分 profile에 該當되는 相變移에 對한 構造 變移를 갖는 3次元의 structural species는 spermine에 의하여 誘發되는 單分子的 凝縮된 構造에 이르는 hydrophobic interaction에 의한 tertiary structure 形成일 것이라 推理한 바, DNA 環境을 hydrophobic 한 條件으

로 만들어 DNA의 3次元의 構造(conformation)의 安定화에 重要한 役割을 하는 base pairs 사이의 hydrophobic interaction을 깨쳐 DNA의 3次元의 構造를 不安定하게 하는 urea가 spermine에 의하여 誘發되는 DNA의 單分子的 凝縮된 構造의 形成 내지 安定성에 妨害的 效果를 미칠 것이 豫測되며 實際 그러할 경우 그것은 앞의 推理를 支持 確認하여 주는 data가 될 것이다.

따라서 本 研究에서는 疎水性 環境試藥인 urea가 spermine-DNA 複合體의 異例의 吸光度-溫度 樣相에 미치는 效果를 調査하여 보았다. 우선 spermine 不在時의 urea가 DNA의 吸光度-溫度 樣相에 미치는 影響을 보여주는 Fig. 1에서 urea의 濃度 增加에 따라  $T_m$ 이 낮아져 melting profile이 왼쪽으로 移動되는 通常의 吸光度-溫度 樣相을 보였다. 그러나 DNA가 凝縮되는 spermine 濃도  $3 \times 10^{-4} M$  存在時에는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 urea의 濃도가 增加함에 따라  $T_m$ 이 낮아지는 것 이외에 異例의 吸光度-溫度 樣相에서 나타나는 downward peak (trough)의 長이가 점점 짧아지면서 그 phase transition midpoint ( $T_c$ )가 낮아지는 것을 볼 수 있다. DNA의 吸光度-溫度 樣相에 影響을 미치는 urea에 의한 phase transition의 特性을 자세히 알아보기 위하여 two-state transition model을 基礎로 하여 계산된 urea의 濃度 變化에 따른 spermine이 存在( $3 \times 10^{-4} M$ ) 할 때와 不在時의  $T_m$  region

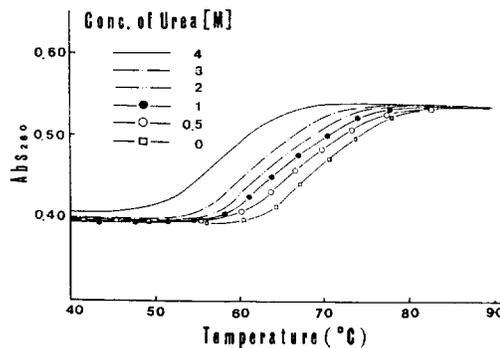


Fig. 1. Effect of urea on the melting profile of DNA in the absence of spermine.

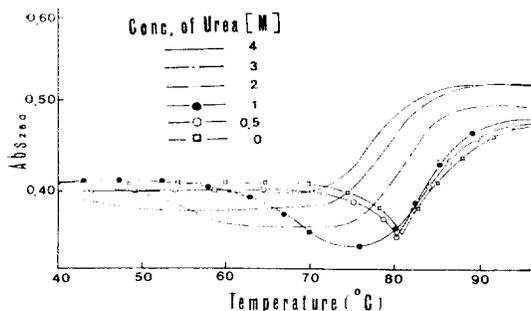


Fig. 2. Dependence of the anomalous melting profile of spermine-DNA complex on urea.

Table 1. Effect of urea on the phase transition enthalpy ( $\Delta H$ ), estimated from the melting profile of the DNA in presence ( $3 \times 10^{-4}M$ ) and absence of spermine, under the assumption of two-state transitions

Conc. of urea (M)	Plus or minus spermine	$\Delta H$ (kcal/mol)	
		trough	$T_m$ region
0.0	Minus spermine	102.2	168.1
0.5	Minus spermine	93.4	167.1
1.0	Minus spermine	91.1	128.5
2.0	Minus spermine	68.5	109.6
3.0	Minus spermine	64.1	92.2
4.0	Minus spermine	51.5	83.0
	Plus spermine	-230.7	168.1
	Plus spermine	-137.4	167.1
	Plus spermine	-78.6	128.5
	Plus spermine	-44.5	109.6
	Plus spermine	-36.0	92.2
	Plus spermine	.	83.0

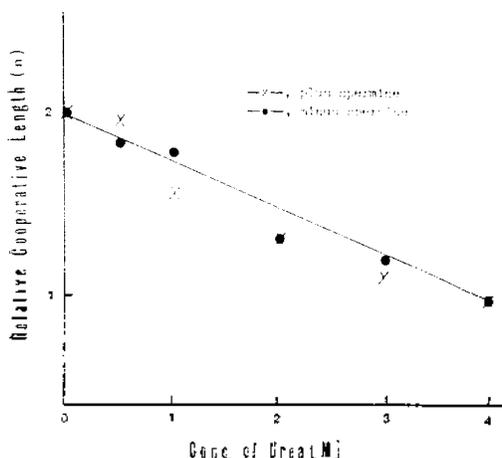


Fig. 3. Urea dependence of cooperative length ( $n$ ) of the  $T_m$ -region phase transition in presence ( $3 \times 10^{-4}M$ ) and absence of spermine.

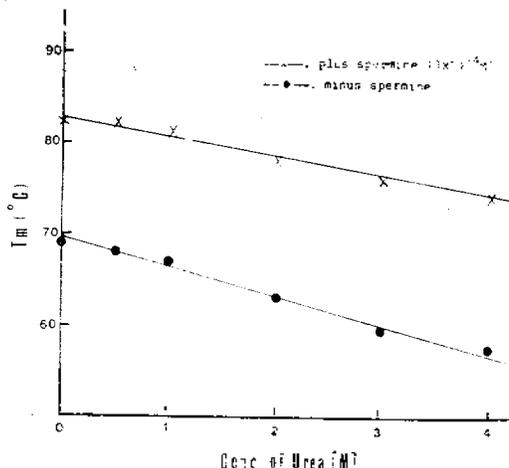


Fig. 4. Variation of  $T_m$  value of DNA with concentration change of urea.

의 transition enthalpy ( $\Delta H$ ) 값과 anomalous melting profile의 downward peak (trough)에 대한  $\Delta H$  값의 변화를 위하여 Table 1에 실었다. 이 표와 urea의 농도 증가에 따른 spermine 존재時와 不在時의  $T_m$  region의 transition에 대한 enthalpy ( $\Delta H$ )와 relative cooperative length ( $n$ ) 값을 比較한 Fig. 3을 함께 分析할 때, melting-region phase의 transition enthalpy ( $\Delta H$ ) 값은 spermine 존재時의 異例의 吸光度-溫度 樣相의 값이 spermine 不在時의 通常의 吸光度-溫度 樣相의 값보다 相對적으로 크게 나타날 뿐 urea의 농도 증가에 따른 relative cooperative length ( $n$ ) 값의 변화는 spermine 존재時와 不在時 거의 같은 값을 나타냈다. 그러나 urea의 농도 증가에 따른  $T_m$  값의 변화를 圖示한 Fig. 4에서 spermine이 존재時 보다  $T_m$  값이 높게 나타났을 뿐 만 아니라 urea의 농도 변화에 따른  $T_m$  값의 변화 폭이 작게 나타났다. 이것은 spermine이 DNA의 두 strands 사이에 架橋結合 (cross linkage) 되어 있어서 urea에 抵抗적으로 作用하기 때문에 spermine 존재時의  $T_m$  값이 不在時 보다 相對적으로 높게 나타났을 뿐 만 아니라 urea 농도 증가에 따른  $T_m$ 이 낮아지는 效果에 있어서도 不在時 보다 덜 敏感하게 나타나는 것으로 推測된다. 또한 spermine 존재時에 나타나는 異例의 吸光度-溫度 樣相에서의 urea 농도 증가에 따른 downward peak

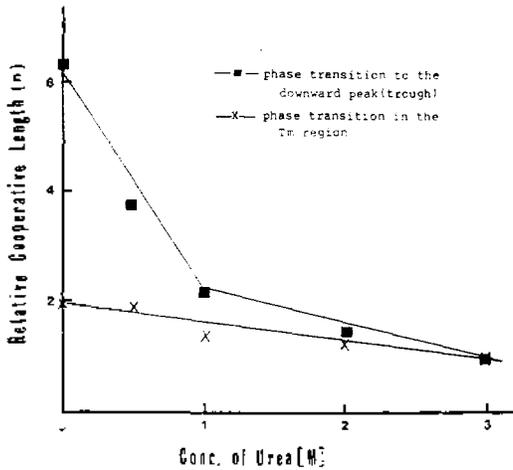


Fig. 5. Effect of urea on the relative cooperative length(n).

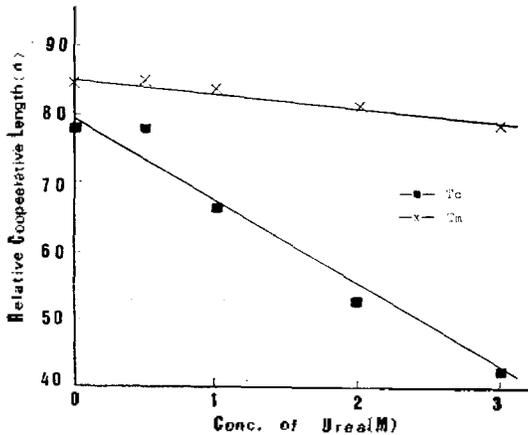


Fig. 6. Effect of urea on phase transition midpoints.

(trough)와 melting-region phase에서의 相對的 cooperative length(n)를 比較한 Fig.5에서 downward peak에서의 相對的 cooperative length(n) 값이 urea 濃度에 훨씬 銳敏하게 影響을 받았으며 urea 濃度에 對한 phase transition midpoint를 比較한 Fig.6에서 urea 濃度 增加에 따라 Tm은 약간 減少하는 경향을 보였으나 trough 形成 相變移의 midpoint (Tc)는 urea 濃度 增加에 따라 급격하게 減少하는 것을 볼 수 있다. Urea가 DNA의 構造變移에 미치는 影響은 DNA가 存在하고 있는 물이 이미 DNA의 hydrogen bonding을 깨치므로 이것 보다는 DNA는 urea에 의하여 DNA base pairs 사이의 hydrophobic

interaction에 影響을 미치리라는 說<sup>26</sup>을 本 實驗 結果와 聯關시키면 spermine  $3 \times 10^{-4} M$  存在時 吸光度-溫度 樣相의 urea에 對한 依存性이 Tm region 보다는 trough 形成 相變移에 銳敏하여 relative cooperative length (n)가 Tm region 相變移 보다는 크고 phase transition midpoint에 급격한 감소를 보인 것은 urea가 DNA의 melting에 關係되는 hydrogen bonding을 끊는 效果 보다는 DNA의 3次元的 構造의 安定性에 關係되는 hydrophobic interaction을 파괴시키는 效果가 더 큼을 나타내 주는 結果라 할 것이다.

따라서 異例的 吸光度-溫度 樣相에 미치는 urea의 影響에 對한 data를 綜合 考察하여 보면 다음과 같다. 즉 spermine에 依하여 誘發되는 凝縮된 DNA 構造는 hydrophobic interaction에 依하여 安定化 될 수 있는 데, DNA의 3次元的 構造의 安定性에 관계되는 DNA base pairs 사이의 hydrophobic interaction을 깨지는 hydrophobic environmental reagent (疎水性 環境 試藥)인 urea가 spermine-DNA 複合體의 異例的 吸光度-樣相에 미치는 影響을 調査한 바 그 downward peak (trough)가 urea 濃度 增加에 따라 점차 사라지는 것으로 보아 downward peak는 hydrophobic interaction의 driving force인 entropy 增加가 溫度 上昇에 따라 有利해 짐으로써 spermine에 의하여 誘發되는 凝縮된 構造가 溫度 上昇에 따라 增加 내지 安定化 됨으로써 基因하는 tertiary structure 形成일 것이라는 推論을 支持하여 주는 實驗 結果가 될 것이다.

謝 辭

本 研究은 1984年度 文敎部의 基礎科學 特性化 分野 研究助成費에 依하여 遂行되었으며, 이에 對하여 當局에 謝意를 表한다.

引用 文 獻

1. V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, and I. Tinoco, Jr., "Physical Chemistry of Nucleic Acids" pp. 332~336, Harper and Row, New York, 1974.
2. R. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 231 (1964).

3. G. Felsenfeld, H. T. Miles, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 407 (1967).
4. L. Levine, J. A. Gordon, and W. P. Jenck, *Biochemistry*, **2**, 168 (1963).
5. S. S. Cohen, "Introduction to the Polyamines", Prentice-Hall, New Jersey, 1971.
6. E. W. Tabor, H. Tabor, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 285 (1976).
7. A. Raina, M. Jansen, and S. S. Cohen, *J. Bacteriol.*, **94**, 1684 (1976).
8. B. Ganem, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 290 (1982).
9. M. Suwalsky, W. Traub, V. Shmueli, and J. Subirana, *J. Mol. Biol.*, **42**, 363 (1969).
10. T.-S. Ko, J. Huh, C. B. Lee, and M. K. Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **27**, 429 (1983).
11. T.-S. Ko and J. Huh, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**, 70 (1984).
12. C. Y. Lee and T. S. - Ko, *J. Korean Chem. Soc.*, **29**, 271 (1985).
13. B. Wolf and S. Hanlon, *Biochemistry*, **14**, 1661 (1975).
14. J. E. Hearst, *Biopolymers*, **3**, 57 (1965).
15. M. Falk, K. A. Hartman, Jr., and R. C. Lord, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3843 (1962).
16. M. Falk, A. G. Poole, and C. G. Goymour, *Can. J. Chem.*, **48**, 1536 (1970).
17. S. B. Zimmerman and B. H. Pfeiffer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2703 (1979).
18. J. Texter, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **33**, 83 (1978).
19. G. S. Manning, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978).
20. R. W. Wilson and V. A. Bloomfield, *Biochemistry*, **18**, 2192 (1979).
21. J. Wodom and R. L. Baldwin, *J. Mol. Biol.*, **144**, 431 (1980).
22. G. S. Manning, *J. Phys. Chem.*, **82**, 2349 (1978).
23. W. S. Yen, K. W. Rhee, and B. R. Ware, *J. Phys. Chem.*, **87**, 2148 (1983).
24. K. A. Marx and T. C. Reynolds, *Biochim. Biophys. Acta*, **741**, 279 (1983).
25. T. J. Thomas and V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **22**, 1097 (1983).
26. C. R. Cantor and P. R. Schimmel, "Biophysical Chemistry", pp. 288~289, San Francisco, 1980.