

Cu²⁺-quinolone 복합체 존재하 DNA의 DNase I에 대한 가수분해 반응성 증가

吳鳳京 · 徐正仁 · 柳馨元 · 高東成[†]
충남대학교 자연과학대학 생화학과
(1989. 7. 10 접수)

Increased Hydrolytic Susceptibility of DNA for DNase 1 in the Presence of Cu²⁺-quinolone Complexes

Bong-Kyeong Oh, Jeong-Ihn Suh, Hyeong-Won Ryu, and Thong-Sung Ko[†]
Department of Biochemistry, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea
(Received July 10, 1990)

특히, 그람음성 세균에 대한 활성을 가지며 *Escherichia coli*, *Proteus* 및 *Klebsiella*류의 감염에 의한 요도염(urinary tract infections)의 임상학적 치료에 유효함이 증명된¹⁻⁵ 합성 항균제인 nalidixic acid(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid)를 비롯한 quinolones 항균제의 개발연구가⁶ 국내외 공히 활발하게 진행되고 있음에도 불구하고 그 작용 메카니즘이 제대로 밝혀지지 못하고 있는 실정이다. 이들은 DNA 합성을 방해 하므로써 항균 기능을 갖는다고 알려져 있으나 그 표적물(target)이 무엇인가에 대하여는 불분명하다. 이들 quinolones는 생리적 pH에서 음이온으로 존재하므로 정전기적 반발로 인하여 다음이온성(polyanionic)인 DNA와의 직접적 상호작용 가능성이 배제되어 왔으며⁷ 일반적인 견해는 DNA gyrase subunit A가 nalidixic acid의 특이한 target인 것으로 알려져 있다^{8,9}. 그러나 또한 nalidixic acid는 파잉의 Cu²⁺가 존재할 경우에만 단일가닥(single-stranded) DNA에 결합하며 이중가닥(double-stranded) 및 supercoiled DNA에는 영향을 없다고 보고된 바^{10,11} 있을 뿐만 아니라 최근에는 nalidixic acid analogue인 norfloxacin의 표적물(target)이 gyrase 아닌 DNA이며 이가(divalent) 금속이온 없

이도 한가닥(single-stranded) DNA와는 결합을 이루지만 두가닥(double-stranded) 또는 supercoiled DNA와는 결합을 이루지 않는다고 알려져 있는¹² 등 quinolones의 target에 대한 연구결과들이 혼선을 빚고 있으며 그들의 분자적 작용 메카니즘이 제대로 알려져 있지 못하고 있는 실정이다. 본 저자들은 이에 대한 구명을 목적으로 하는 연구의 일환으로 본 연구를 수행하였다.

한 ligand가 DNA와 anticooperative 결합방식에 의한 상호작용을 할 경우 그 DNA의 DNase I에 대한 가수분해반응성(susceptibility)을 증가시킬 가능성이 있으므로¹³⁻¹⁵ 송아지 흉선 DNA의 DNase I에 대한 susceptibility에 미치는 이들 metalloquinolones의 효과를 알아 보았다. 기질 DNA 용액에 가해지는 quinolone 항균제, 즉 pipemidic acid, oxolinic acid, nalidixic acid 등의 일정농도(10 μM)하에서 금속 농도변화에 따른 DNase I에 대한 본성 DNA와 열변성 DNA의 가수분해 반응성을 탐구하는 실험에서 DNase I의 활성도 측정은 trichloroacetic acid 대신 perchloric acid를 함유하는 수정된 MacFadyen's reagent^{16,17}를 사용하여 가수분해 결과 유리되는 acid-soluble hydrolyzate supernatant의 260 nm에서의 자외흡광도 측정방법을 사용하였으며 반

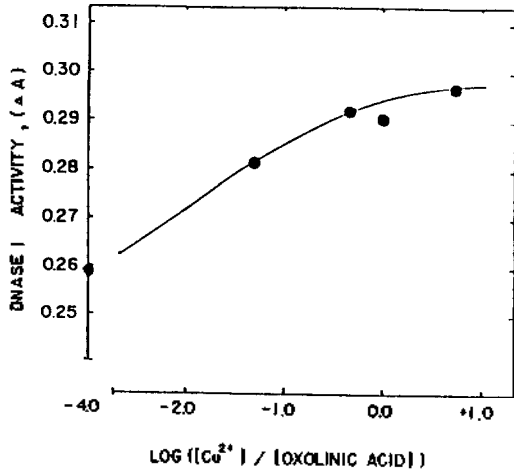


Fig. 1. Effect of oxolinic acid on the susceptibility of native DNA to DNase I at various concentration of Cu^{2+} . The enzyme reactions were carried at 25°C, pH 5.0 in a buffer of 30 mM MgCl_2 , 5 mM NaCl, and 8 mM acetate.

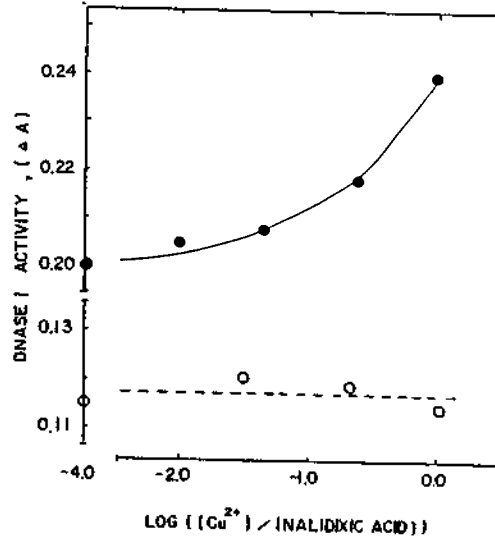


Fig. 3. Effect of nalidixic acid on the susceptibility of native DNA (●) and denatured DNA (○) to DNase I at various concentrations of Cu^{2+} . The enzyme reactions were carried at 25°C, pH 5.0 in a buffer of 30 mM MgCl_2 , 5 mM NaCl, and 8 mM acetate.

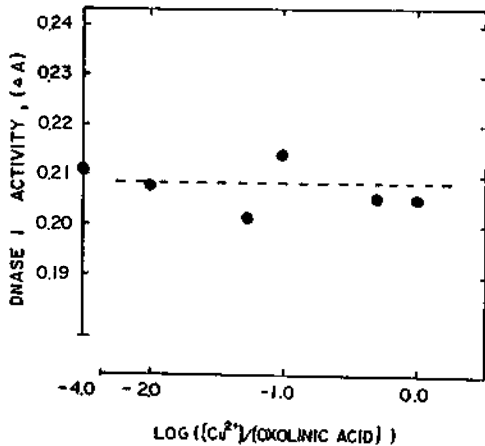


Fig. 2. Effect of oxolinic acid on the susceptibility of denatured DNA to DNase I at various concentrations of Cu^{2+} . The enzyme reactions were carried at 25°C, pH 5.0 in a buffer of 30 mM MgCl_2 , 5 mM NaCl, and 8 mM acetate.

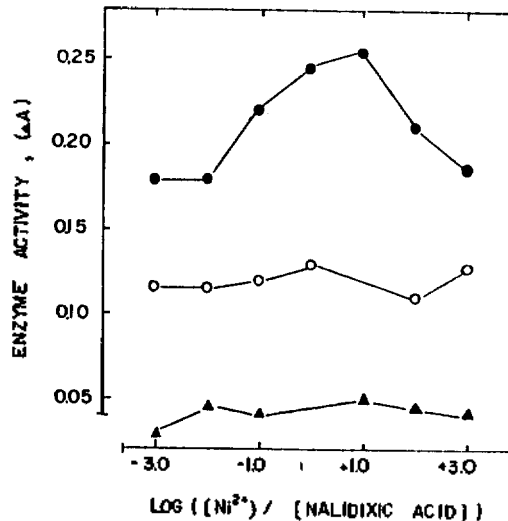


Fig. 4. Effect of nalidixic acid on the susceptibility of native DNA (●) and denatured DNA (○) to DNase I and RNA (▲) to RNase A at various concentrations of Ni^{2+} .

응혼합물 완충용액의 조성 및 기타 반응조건들은 이미 보고된 방법을¹⁸ 따랐다. Fig. 1~4에서 보여주는 바와 같이 DNase I에 대한 가수분해 반응성이 본성 DNA의 경우는 금속이온 농도 증가에 따라서 증가하지만 그와 대조적으로 변성 DNA의 경우에는 그러한 효과가 없음을 알 수 있다. 특히 Cu^{2+} -oxoli-

nic acid와 Ni^{2+} -nalidixic acid의 경우에는 금속이온의 농도가 quinolone 이온의 1 : 1의 몰비를 이룰 경우 본성 DNA의 DNase I에 대한 가수분해반응성이 최대가 됨을 알 수 있다. 이 농도의 Cu^{2+} , 또는

Ni²⁺만이 존재할 경우 이들 각 이온은 DNase 1 활성도에 별 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 금속이온과 quinolone drug가 1 : 1의 몰비로 intercalative 복합체를 이룬다는 분광학적 적정 데이터와 일치됨을 알 수 있다^{19,20}. [분광학적 적정에 의한 Cu²⁺-oxolinic acid 및 Ni²⁺-nalidixic acid(1 : 1) 복합체의 안정성상수는 상온에서 각각 3×10^5 과 3×10^4 이다(q.v. 19 & 20)]. Fig. 4에서 $[Ni^{2+}]/[drug] > 10$ 에서의 DNase 1 활성도 감소는, drug 농도는 일정하게 제한되어 있으므로, 증가되는 과잉의 Ni²⁺ 농도의 효소촉매반응에 대한 inhibition 효과에 기인한다고 생각할 수 있다.

본 연구는 한국과학재단의 연구비에 의하여 수행되었습니다. 재단에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. W. H. Deitz, J. H. Bailey, and E. J. Froelich, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 583 (1963).
2. T. A. Stamey, *Postgrad. Med. J.*, 47, Suppl., 21 (1971).
3. W. Brumfitt and R. Pursell, *Postgrad. Med. J.*, 47, Suppl., 16 (1971).
4. L. H. Harrison and C. E. Cox, *J. Urol.*, 104, 908 (1970).
5. Y. S. Kim, *Prog. Chem. & Chem. Industry*, 26, 689 (1986).
6. E. T. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, "The Molecular Basis of Antibiotic Action", 173-277 Wiley, London, 1984.
7. M. E. Dreyfuss and J. M. Midgley, *J. Pharm. Pharmacol. Suppl.*, 35, 75 (1983).
8. A. M. Pedrini, "Antibiotics, V/Part 1. Mechanism of Action of Antibacterial Agents", F. E. Hann Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, 1979.
9. A. Sugino, C. Peebles, K. Kruezer, and N. R. Cozzarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 4767 (1977).
10. N. R. Cozzarelli, *Science*, 207, 953 (1980).
11. G. C. Crumpline, J. M. Midgley, and J. T. Smith, *Top. Antibiot. Chem.*, 8, 9 (1980).
12. L. L. Shen and A. G. Pernet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 307 (1985).
13. P. Nagley & A. W. Linnane, *J. Mol. Biol.*, 66, 181 (1972).
14. C. Paoletti, H. Couder, & M. Guerineau, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 48, 950 (1972).
15. T. -S. Ko, J. Huh, C-B Lee, & M. K. Park, *J. Kor. Chem. Soc.*, 27, 429 (1983).
16. 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.
17. D. A. MacFadyen, *J. Biol. Chem.*, 107, 297 (1934).
18. T. -S. Ko and C. Y. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, 29, 304 (1985).
19. J. I. Suh, M. Sc. Thesis, Chungnam National University, 1986.
20. B. K. Oh, M. Sc. Thesis, Chungnam National University, 1987.