

DNA와 상호작용에서 T4 endonuclease V의 C-말단 부위의 역할에 관한 분광학적 연구: 핵자기공명과 형광 실험

유준석 · 임형미 · 임후강 · 신정휴* · 이봉진*

서울대학교 약학대학, *서울대학교 화학과

(Received October 20, 1996)

The Spectroscopic Study on the Role of C-terminal Region of T4 endonuclease V in the Interaction with DNA: NMR and Fluorescence Experiment

Jun Seok Yu, Hyung Mi Lihm, Hu Kang Ihm, Jung Hyu Shin* and Bong Jin Lee*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—In order to study the role of C-terminal aromatic region of T4 endonuclease V in the interaction with substrate DNA, NMR and Fluorescence spectrum were recorded. Analysis of fluorescence emission spectra showed that C-terminal region of T4 endonuclease V is in or very near the binding site. In the HSQC spectrum of ¹⁵N-Tyr-labeled T4 endonuclease V•DNA complex, the broadening of a peak was observed. It is presumed that this peak corresponds to one among three tyrosine residues which belong to the WYKYY segment of C-terminal region of T4 endonuclease V. Interactions of peptide fragments consisting of C-terminal residues of T4 endonuclease V with DNAs(TT-, T⁺T-DNA) were investigated by NMR and Fluorescence experiment. The results suggest that two peptide fragments themselves bind to DNAs and their binding pattern is not an intercalation mode.

Keywords □ T4 endonuclease V (T4 endo V), Peptide fragment, NMR, Fluorescence.

생체 유전물질인 DNA는 방사선, 자외선, 화학물질 등 여러 변이원에 의해 손상을 입고 있으며, 이들에 의해 생긴 DNA 손상은 돌연변이 또는 치사의 원인이 된다. 그러나 DNA 손상의 대부분은 생체내에 존재하는 효소에 의해 수복되어 DNA는 안정하게 유지된다. 이와같은 DNA 수복은 생명의 유지, 종의 보존에 중요한 역할을 하고 있다. 옛부터 T₄ phage는 다른 T-even phage에 비해, UV 조사에 의한 손상에 대해 저항성을 나타내는 것이 알려져 있어¹⁾, UV 손상을 수복하는 효소를 갖고 있다고 여겨져왔다. W. Harm은 UV 조사에 대해 감수성이 높은 변이주 T₄ V주를 발견하였다.²⁾ 그 후, Sek-

iguchi등은 T₄ phage을 감염시킨 대장균중에, UV를 조사한 2분쇄 DNA에 대해 1분 절단을 행하는 효소가 존재하는 것을 찾아냈다.³⁾ 이 효소는 T₄ V주를 감염시킨 대장균 안에는 존재하지 않는 것으로 보아 이 효소가 T₄ phage의 DNA 수복효소라고 여겨져, T₄ endonuclease V라고 명명되었다. 이 효소는 Sekiguchi등에 의해 완전히 정제되어, 분자량 16,000의 단백질이라는 것을 알았다.^{4,5)}

T4 endonuclease V는 작은 효소이면서, pyrimidine dimer-DNA glycosylase와 apyrimidinic DNA endonuclease라는 2개의 효소활성을 갖고 있다. 이 효소는 nucleotide 제거 수복 기구의 제1단계에서 dimer를 형성한 5'측 pyrimidine의 glycosyl 결합을 절단해 apyrimidinic site (AP site)를 생성시키고, 제2단계에

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7869 (팩스) 02-872-3632

서 이 AP site의 3' 측의 인산 ester결합을 절단한다. 한편 인간의 질환인 색소성 건피증(xeroderma pigmentosum)은 태양광선, 특히 자외선에 의해 고빈도로 피부암을 발생하는 데 이 질환은 유전적으로 DNA 수복기구에 장애가 있기 때문에 일어나는 것으로 밝혀졌다.⁶⁾ 그 후 색소성 건피증의 배양세포에 T4 endonuclease V를 도입하면 세포의 DNA 수복능력이 회복되는 것이 밝혀져^{7, 8)} 이 질환이 제거수복의 제1단계, 즉 endonuclease의 결손에 의한 것임이 시사되었다. 이것은 인간과 phage라는 서로 멀리 떨어진 생물중에 공통의 DNA 수복기구가 존재한다는 것을 나타내고 있다.

T4 endonuclease V가 가진 두가지 효소활성인 DNA glycosylase와 AP lyase의 activity는 이온강도, 온도, pH에 따라 서로 독립적으로 변하기 때문에 T4 endonuclease V의 서로 다른 부위들이 이들 activity에 각각 관여할 것이라는 보고가 있었다.^{4, 9)} T4 endonuclease V의 3차 구조가 X-ray 결정구조로 밝혀졌고¹⁰⁾, site-directed mutagenesis 결과와 더불어 Glu-23이 glycosylase 작용의 핵심잔기임을 알아냈다.¹¹⁾ Arg-3을 비롯한 amino terminus가 T4 endonuclease V의 작용에 중요하다는 사실도 보고되었다.^{12, 13)} Lys-Trp-Lys, Lys-Tyr-Lys 같이 aromatic residue를 가지는 간단한 tripeptide가 AP lyase activity를 가진다는 보고가 있었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 흥미롭게도 T4 endonuclease V에는 C-terminal region에 aromatic cluster를 이루는 Trp-Tyr-Lys-Tyr-Tyr (WYKYY: 128~132) segment가 존재한다. Site-directed mutagenesis를 이용하여 이 region이 T4 endonuclease V의 activity에 미치는 영향을 연구한 결과가 보고되었다. Lys-130은 절단반응이 아니라 pyrimidine dimer specific binding에 관여하고¹⁷⁾, Tyr-129와 -131 역시 specific binding에 중요하다는 보고가 있었다.¹⁸⁾ 그리고 Lys-130 주위의 aromatic amino acid가 glycosylase activity에 중요하다는 보고도 있었다.¹⁹⁾ 최근에는 NMR 테크닉의 일종인 photo-CIDNP 실험결과를 바탕으로 T4 endonuclease V의 C-terminal region이 DNA binding에 관여한다는 사실을 확인했다.²⁰⁾

이 논문에서는 WYKYY segment를 포함하는 C-terminal region의 집중적인 연구를 위해 다음과 같은 전략으로 접근했다. Trp-128 잔기는 Fluorescence를 통해, Tyr-129, -131, -132 잔기는 ¹⁵N-Tyrosine labeled T4 endonuclease V의 2D HSQC NMR 실험

을 통해 연구했다. 그리고 T4 endonuclease V의 C-terminal region으로 이루어진 peptide fragment를 합성해 Fluorescence와 NMR을 관찰했다. 이로써 기질인 DNA와의 결합에 있어서 T4 endonuclease V의 C-terminal region의 역할에 관한 지견을 얻고자 하였다.

실험방법

단백질 labeling 및 정제

- wild-type T4 endo V의 제조: T4 endo V의 유전자를 갖는 플라스미드를 transformation한 대장균을 배양한 후 이전에 기술한 방법대로 정제하였다.²¹⁾

- ¹⁵N-Tyrosine labeled T4 endo V의 제조: tac promoter와 T4 endo V 유전자를 소유한 plasmid를 대장균에 transformation한 후 LB배지에서 배양했다. 그것을 50 µg/ml ampicillin, 1% glucose, 0.01% ¹⁵N-tyrosine, 그리고 tyrosine 외의 0.01% 각 아미노산을 함유한 2 l M9 배지에 접종했다. 30°C에서 0.6~0.7 OD까지 배양 후, 200 µg/ml의 IPTG로 induction했다. 3~4시간 후 원심으로 집균했다. 정제를 위해 buffer A (pH 6.5, 50 mM potassium phosphate, 1 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol)에 pellet을 재현탁시키고 sonication을 하였다. 균체의 찌꺼기를 원심으로 제거하고 상등액을 buffer B (pH 6.5, 50 mM potassium phosphate)로 평형화된 Bio-*rex* 70 ion-exchange column에 걸었다. 0~1 M KCl salt-gradient로 단백질을 elution시킨 후 fraction을 취했다. 전기영동으로 확인된 단백질 fraction을 Centriprep(Amicon)으로 농축했다. 단백질의 순도는 SDS-PAGE로 확인한 결과 99% 이상이었다.

DNA 합성 및 정제

T4 Endo V의 기질로서 thymine dimer를 함유하는 10 mer DNA를 protected thymine dimer derivative를 사용하여 합성하였다.²²⁾ 한편 T4 Endo V는 thymine dimer를 포함하는 specific DNA와 이를 포함하지 않는 nonspecific DNA를 구별하여 repair 작용을 나타내므로 nonspecific DNA도 합성하였다. Nonspecific DNA는 DNA synthesizer를 사용하여 합성하였다. DNA 합성은 500 OD 이상 하였다. 그리고 DNA의 길이는 10 mer이상인 경우 단백질의 bind-

ing에 큰 영향을 미치지 않으므로 모두 10 mer로 하였다. 합성한 thymine dimer 함유 DNA (-T[^]T-) 및 3종류의 nonspecific DNA (-TT-, -AT-, -GC-)의 sequence는 다음과 같다.

T [^] T-DNA	TT-DNA
d(GCGGT [^] TGGCG)	d(—TT—)
(CGCCA ACCGC)d	(—AA—)d
AT-DNA	GC-DNA
d(—AT—)	d(—GC—)
(—TA—)d	(—CG—)d

(—) 은 T[^]T-DNA에서 바뀌지 않은 sequence를 나타낸다.

DNA 정제는 다음과 같이 행하였다. 우선 crude product를 역상 HPLC로 0.1M triethylammonium acetate (pH 7.0)에 40분 동안 5~50% acetonitrile gradient를 걸어 main peak를 분취하였다. 이 DNA를 pyridine dowex column을 통과시켜 pyridine 형태로 만든 후, 이것을 다시 Na⁺ dowex column을 통과시켜 Na⁺ 형태로 만들었다.

그리고 Chelex column을 통과시켜 paramagnetic 금속이온을 제거하였다. 이것을 동결건조 시킨 후 농도결정을 하고, 상보적인 strand와 80°C에서 annealing하여 double strand를 만들었다. 동결건조한 후 Sephadex column을 통과시켜 single strand를 제거하고 desalting을 하였다. 이것을 최종적으로 동결건조시켜 99% 이상의 순도를 가지는 고체상태의 sample로 만들었다.

Peptide 합성 및 정제

Peptide는 solid-phase method에 의해 합성되었다. 합성된 두가지 peptide는 T4 Endo V의 C-terminal region의 Ala 123~Ala 135 (13 mer), Gln 124~Ala 138 (15 mer)로 각각 이루어져 있다. Amino acid sequence는 다음과 같다.

T4-PEP13 : AQRPTWYKYYGKA (M.W. 1630)

T4-PEP15 : QRPTWYKYYGKAIYA (M.W. 1906)

정제는 다음과 같이 행하였다. 역상 HPLC를 이용해 0.1% TFA aqueous solution과 90% acetonitrile solution (in 0.1% TFA solution)의 45분에 걸친

linear gradient를 걸어 crude product의 main peak를 분취한 후, 순도를 높이기 위해 동결건조를 몇 번 반복하였다. 최종적으로 99% 이상의 순도를 가지는 고체상태 peptide를 얻었다.

NMR 실험

Sample buffer로는 50 mM potassium phosphate (pH 6.5)를 사용하였고 90% H₂O/10% D₂O로 NMR sample을 준비했다. 1D 실험에는 JEOL GSX 400 MHz를 2D 실험에는 Bruker AMX 500 MHz NMR 기기를 사용했다. H₂O 속에서의 1D 실험은 1-1 echo pulse를 사용하여 측정했다. 2D 실험에서 time-domain one-dimensional data가 baseline-corrected되었고 Fourier transformation 전에 양측에 Sine square window function이 적용되었다. Chemical shift 값은 2,2-dimethyl-2-silapantane-5-sulfonate를 기준으로 했다.

Fluorescence 실험

단백질, 펩타이드, DNA를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 녹여 sample을 준비했다. Fluorescence data는 tryptophan을 280nm에서 excitation하여 300~450 nm 범위에서의 emission spectrum을 취함으로써 얻어졌다. 사용한 기기는 JASCO FP-777이다.

실험결과

T4 endo V와 3가지 종류 DNA (TT, AT, GC-DNA)의 복합체 형성시 Fluorescence spectrum 변화

단백질의 internal fluor로는 tryptophan, tyrosine, phenylalanine이 있다. 이들의 fluorescence spectrum으로 부터 단백질의 conformation에 관한 정보를 얻을 수 있는 데, 주로 tryptophan이 사용된다. 흥미롭게도 T4 endo V에는 tryptophan이 WYKYY segment의 Trp-128 하나 뿐이어서 T4 endo V와 DNA의 binding에 있어서 C-terminal region의 연구에 유리한 조건을 제공한다. T4 endo V의 tryptophan 잔기의 emission wavelength는 tryptophan의 emission wavelength와 동일했다. 이로 부터 T4 endo V의 tryptophan 잔기가 표면에 노출되어 있음을 확인했다. 3가지 종류의 DNA를 첨가했을 때 모

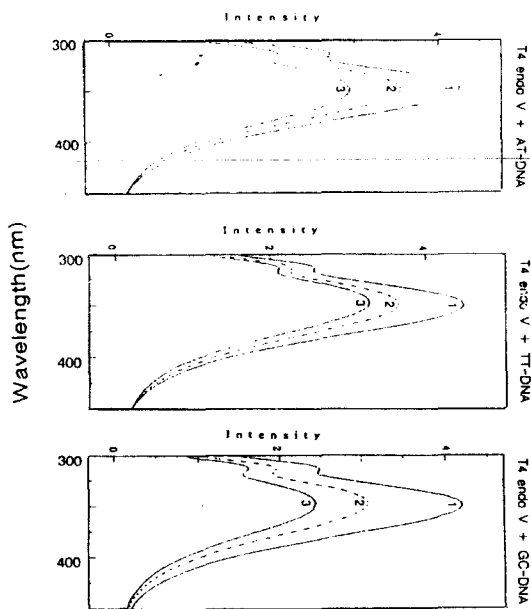


Fig. 1— Fluorescence emission spectra of T4 endo V and its complex with 10mer DNAs. Trace 1 was the emission spectrum of T4 endo V alone; traces 2, 3 were the emission spectra when the mole ratio of DNA to T4 endo V was 1, 2, respectively. The concentration of T4 endo V was 5 μ M.

든 스펙트럼에서 tryptophan의 quenching 현상이 관찰되었다(Fig. 1). 이로부터 T4 endo V는 사용된 3종류의 DNA 모두에 결합함을 알았다. 이것은 T4 endo V와 DNA가 nonspecific binding을 한다는 사실과 tryptophan 잔기가 그 결합에 관여함을 보여 준다.

T4-PEP13, T4-PEP15에 T[^]T, TT-DNA의 titration시 fluorescence spectrum 변화

앞과 동일하게 먼저 peptide fragment의 fluorescence spectrum을 얻었다. 앞의 T4 endo V와 3종류의 nonspecific DNA와의 복합체 실험에서 nonspecific binding 사실을 확인하였기 때문에 대표적으로 TT-DNA만을 peptide와의 결합실험에 사용하였다(Fig. 2, 3). T4-PEP13과 T4-PEP15에 TT-DNA를 titration했을 때, T4 endo V와 마찬가지로 tryptophan의 quenching이 관찰되었다. 이로부터 T4 endo V의 C-terminal region으로 이루어진 peptide fragment만으로도 DNA에 결합한다는 것을 알았다. T4 endo V에 T[^]T-DNA를 첨가하면 순식간에 DNA가 분해되므로 NMR 실험이 불가능하다. 그 동안의 실험결과에서 C-

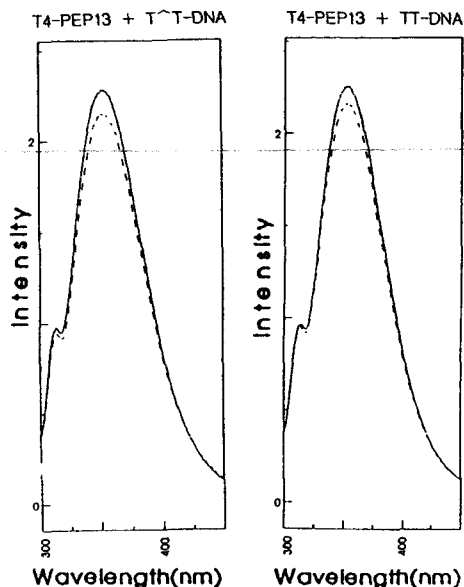


Fig. 2— Fluorescence emission spectra of T4-PEP13 (upper line) and their complexes with 10mer DNAs (lower line). The mole ratio of DNA to T4-PEP13 was 1, and the concentration of T4-PEP13 was 0.15 μ M. The excitation wavelength was 280 nm.

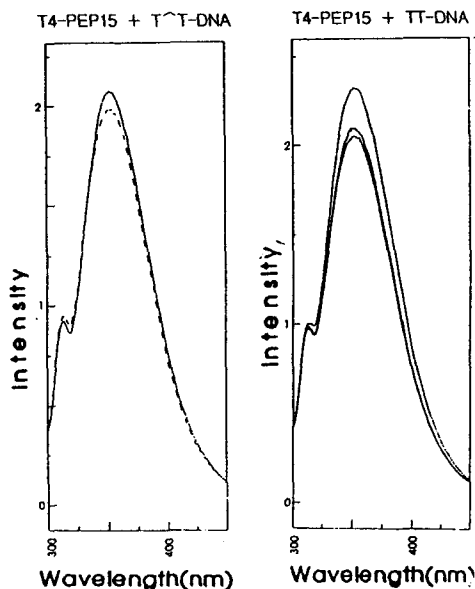


Fig. 3— Fluorescence emission spectra of T4-PEP15 (upper line) and their complexes with 10mer DNAs (lower line). The mole ratio of DNA to T4-PEP15 was 1, and the concentration of T4-PEP15 was 0.15 μ M. The excitation wavelength was 280 nm.

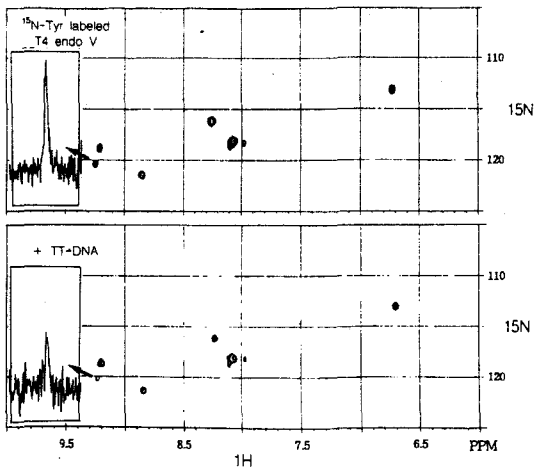


Fig. 4—The HSQC spectra of ^{15}N -Tyr labeled T4 endo V (top) and its complex with 10 mer TT-DNA (bottom). The concentration of ^{15}N -Tyr labeled T4 endo V was 1 mM. The 1D-slice spectrum of a broadened peak is shown by a box.

terminal region은 결합에 관여하지만 활성화부위가 아니라는 것이 알려져 왔기 때문에 peptide fragment에 T \wedge T-DNA를 titration해도 DNA의 분해는 일어나지 않을 것이라고 예상할 수 있다. 그래서 T4-PEP13, T4-PEP15에 T \wedge T-DNA를 titration하여 fluorescence spectrum 변화를 관찰하였다(Fig. 2, 3). TT-DNA와 마찬가지로 tryptophan의 quenching이 관찰되었다. 결과적으로 T4 endo V의 C-terminal region이 specific 그리고 nonspecific DNA와의 결합에 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

^{15}N -Tyrosine labeled T4 endo V와 TT-DNA의 복합체 형성시 2D HSQC spectrum의 변화

^{15}N -Tyrosine labeled T4 endo V의 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) spectrum에서 T4 endo V의 7개 tyrosine 잔기를 확인하였다. TT-DNA를 첨가했을 때 F2 축의 9.2 ppm 근처 peak의 broadening이 관찰되었다(Fig. 4). Peak의 broadening 현상은 macromolecular의 상호작용연구에서 binding 여부를 보여주는 indicator이다. 왜냐하면 결합에 관여하는 잔기는 free한 상태에 비해 mobility가 감소함으로써 회전회전시간이 줄어들어 NMR spectrum 상에 broadening이 일어난 peak가 관찰되기 때문이다. T4 endo V의 C-terminal region이 DNA와의 결

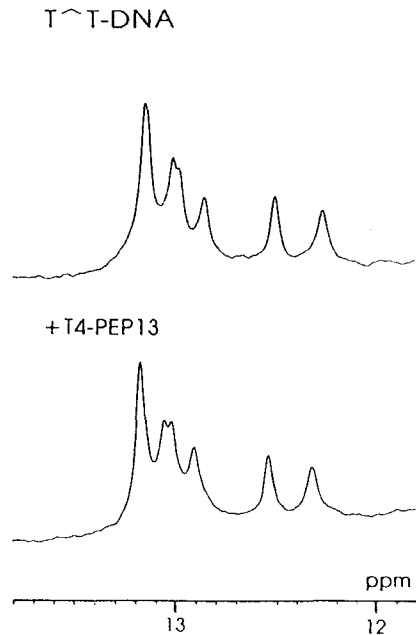


Fig. 5—Imino proton resonances of 10 mer T \wedge T-DNA and its complex with T4-PEP13. The mole ratio of T4-PEP13 to DNA was 1, and the concentration of DNA was 0.1 mM. The buffer was 50 mM potassium phosphate (pH 6.5), and the temperature was 27°C.

합에 중요하다고 제안한 이전의 보고를 바탕으로 고려할 때 broadening이 일어난 peak가 WYKYY에 속하는 3개의 tyrosine 잔기 중 어느 것인지는 아직 확인할 수 없지만 그 중에 하나의 peak에 해당하리라고 추측된다.

T4-PEP13, T4-PEP15와 T \wedge T-DNA, TT-DNA 복합체 형성시 DNA의 1D NMR spectrum 변화 관찰

Fluorescence spectrum의 결과를 바탕으로 1D NMR 실험을 하였다. T \wedge T-DNA에 T4-PEP13을 첨가했을 때, DNA imino proton resonance의 변화 여부를 관찰했다. T4-PEP13 첨가 전과 후의 spectrum을 겹쳐 보아 작은 chemical shift 변화가 일어났음을 알았다(Fig. 5). 그리고 TT-DNA에 T4-PEP13과 T4-PEP15를 각각 첨가했을 때도 chemical shift 변화가 관찰되었다(Fig. 6). 화살표한 13.1~13.2 ppm 근처의 두 peak에서 오른쪽 peak가 왼쪽으로 0.03 ppm (측정오차: 0.004 ppm) 크기의 작은 downfield shift를 보임으로써 두 peak의 폭대기 모양이 무디어진 것을 볼 수 있다. 이로부터 두 peptide fragment와 두 DNA의 결합을 fluorescence data에 이어 다시 확인

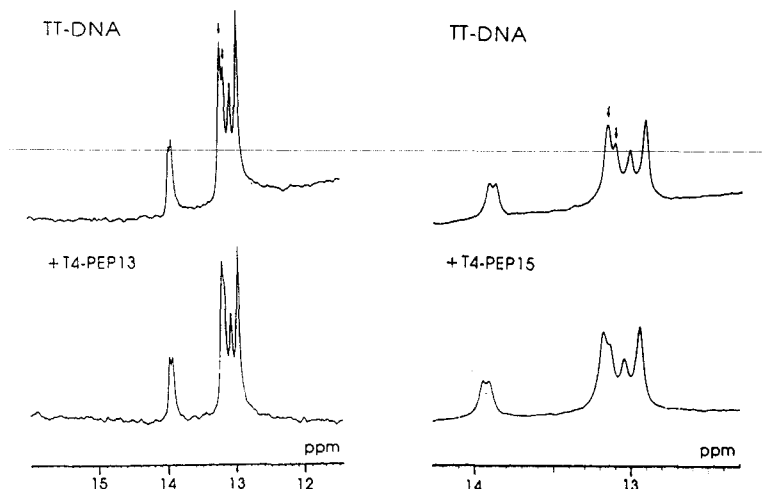


Fig. 6— Imino proton resonances of 10 mer TT-DNA and their complexes with peptide fragments. The mole ratio of peptide fragment to DNA was 1, and the concentration of DNA was 0.2 mM. The buffer was 50 mM potassium phosphate (pH 6.5), and the temperature was 27°C.

했다. 그리고 눈에 띄는 chemical shift 변화가 관찰되지 않은 것으로 부터 aromatic ring cluster인 WYKYY segment가 존재함에도 불구하고 T4-PEP 13, T4-PEP15는 intercalation binding을 하지 않는다는 것을 알 수 있다.

고 찰

T4 endo V와 DNA의 복합체 형성시 C-terminal의 conformation 변화를 관찰하기 위해 Fluorescence 실험에서 tryptophan을 probe로 사용하였다. Fluorescence data로 부터 C-terminal region은 DNA와의 결합에 관여하며 이것은 site-directed mutagenesis 실험결과와 잘 일치함을 알았다. WYKYY segment에서 tryptophan 잔기 외의 aromatic amino acid인 tyrosine 잔기를 연구하기 위해서 tyrosine을 isotope-labeling한 T4 endo V (tyrosine의 위치를 Fig. 8에 보임)를 준비했다. 앞서 말했듯이 ¹⁵N-Tyrosine labeled T4 endo V와 DNA 복합체의 HSQC spectrum에서 broadening이 관찰된 한 peak는 DNA와의 결합에 관여하는 WYKYY segment 중의 tyrosine 잔기 하나에 해당한다는 것을 짐작할 수 있는데, 이 결과는 tyrosine 잔기의 거동에 관한 이전의 site-directed mutagenesis 실험결과에 비해 보다 직접적인 증거라 할 수 있다. 나아가 이 실험에

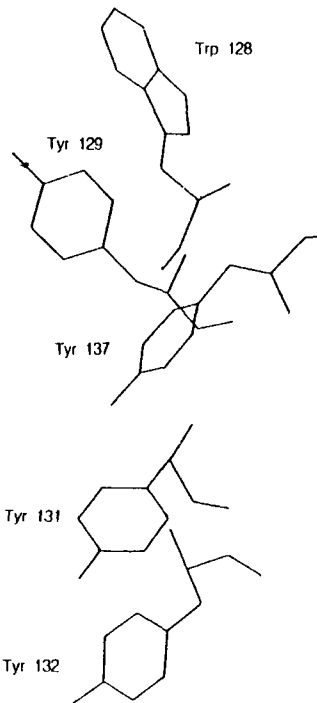


Fig. 7— Relative orientation of the side chains of aromatic C-terminal amino acids (WYKYY). These data is from a X-ray crystal structure of T4 endo V.

서 얻은 NMR data는 T4 endo V를 각 아미노산 별로 isotope-labeling해서 T4 endo V의 작용기전에 대한 원자 혹은 분자 수준에서의 이해를 위한 연구에 활용되

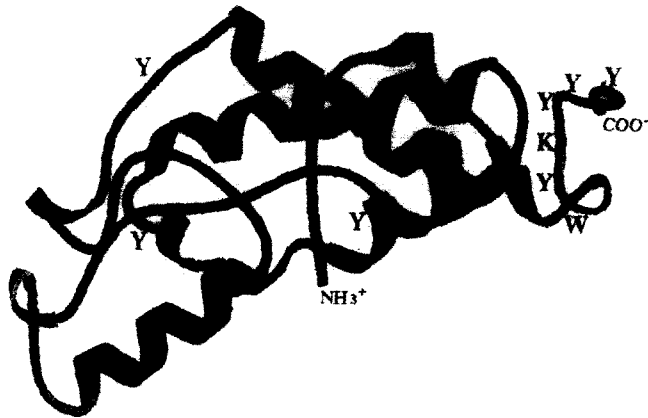


Fig. 8 — Schematic diagram illustrating the tertiary structure of T4 endo V, obtained using X-ray data and the program Ribbons. The loop structure of the C-terminal aromatic region is shown.

어질 것이다.

X-ray 결정구조를 바탕으로 T4 endo V의 WYK-YY segment의 side chain의 상대적인 orientation을 Fig. 7에서 보여주고 있다. DNA와의 결합에서 이 side chain들이 중요하리라는 사실을 확인하기 위해 T4 endo V의 C-terminal region으로 이루어진 2종류의 peptide를 합성하여 NMR 연구를 하였다. T4-PEP13, T4-PEP15와 DNA의 interaction 연구에서 이들 peptide fragment만으로도 DNA에 결합한다는 사실을 알았다. 이것은 T4 Endo V의 WYKYY segment (aromatic ring cluster)를 핵심으로 하는 C-terminal region이 substrate binding에 결정적 역할을 한다는 이전의 보고를 뒷받침하는 것이다. 위의 결과는 C-terminal region이 단백질의 3차 구조 형성에 힘입어 DNA에 접근하게 됨으로써 interaction한다는 수동적인 의미가 아니라, 이 region이 DNA와 직접 interaction한다는 능동적 의미를 부여한다. 그리고 peptide와 DNA의 interaction을 연구한 이 실험은 binding 양식에 관한 하나의 사실을 제공한다. T4 Endo V와 DNA의 복합체 연구에서 C-terminal region의 intercalation binding에 관한 보고가 없었다. 하지만 이 region이 단백질 내에 존재하지 않는 하나의 독립적인 peptide fragment, 즉 T4-PEP13, T4-PEP15 형태로 되었을 때 이들 peptide는 aromatic ring cluster인 WYKYY segment를 가지고 있음으로써, aromatic ring을 가진 ligand가 취하기 쉬운 binding 양식인 intercalation binding을 할 가능성이 존재한다. 실험결과 intercalation시 발생하는 ring

current effect로 인한 현저한 chemical shift 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 T4-PEP13, T4-PEP15는 intercalation binding을 하지 않는다는 것을 알았다. 예측컨대 이들 peptide fragment의 DNA binding 양식은 intact protein인 T4 Endo V 내에 존재할 때의 binding 양식과 유사할 것 같다. 아마도 DNA groove에 binding하는 것 같다. T4-PEP13과 T4-PEP15는 DNA와의 interaction에서 거의 같은 양상을 보였는데, 이들 중 2개의 residue를 더 가지고 있는 T4-PEP15는 NMR sample 제조과정에서 용해도가 낮은 문제점을 보였다.

DNA의 각 base pair당 하나씩 존재하는 imino proton은 DNA의 conformation 변화에 매우 민감하며, 그것의 resonance가 다른 resonance에 비해 저자장영역에 나타나므로 overlap이 되지 않는다. 그래서 DNA의 imino proton의 resonance는 단백질 혹은 peptide와의 결합에 의해 야기되는 DNA의 helix conformation의 변화를 관찰하는 데 유용하다. Fig. 5, 6에서 peptide와의 복합체 형성시 작은 chemical shift 변화가 일어난 peak는 관찰되었지만 imino proton resonance의 전체 pattern에는 큰 변화가 없음을 관찰할 수 있었다. 이것은 peptide fragment가 DNA와 결합한다는 사실을 보여 주는 동시에 그 결합으로 인해 DNA의 전체 구조에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 시사하고 있다.

T4 endo V는 뚜렷한 2가지의 절단기능을 가지고 있다는 사실에도 불구하고 하나의 compact한 domain으로 이루어져 있다. 이 효소는 3개의 α -helix, 5개의 re-

verse turn, extended chain segments, 그리고 loops으로 구성되어 있다. 따라서 구조는 all- α helical protein으로 분류될 수 있다. Main chain fold의 가장 주요한 특징은 amino-terminal의 7개 residue의 segment가 두개의 주요 helix, H1과 H2 사이로 끼어 들어가 있는 것이다(Fig. 8). 이러한 구조를 가지는 T4 endo V는 세부적으로 4가지의 기능이 있다. DNA의 인식, DNA와의 결합, PD DNA glycosylase activity를 통한 glycosyl bond의 절단, 그리고 AP lyase activity를 통한 phosphate backbone의 절단이 그 기능들이다. T4 endo V의 이러한 기능들과 구조의 상관관계를 밝히기 위한 노력이 계속되었음에도 불구하고 이들 기능에 관여하는 특정잔기를 결정짓는 일은 많은 어려움을 겪어 왔다. 현재는 서론에서 밝혔듯이 몇몇 잔기들이 T4 endo V의 절단기능에 중요하다는 것이 site-directed mutagenesis 실험에 의해 보고되어 있다. 그리고 T4 endo V의 aromatic cluster를 이루는 WYKYY segment를 포함하는 C-terminal region은 이 단백질에 대한 연구에 있어서 주요한 표적이 되어왔다. 그동안의 보고에서 C-terminal region은 절단기능 혹은 결합기능의 역할을 한다고 알려져 있고, 현재로서는 이 두기능이 서로 배타적인 것이라고 단정할 수 없다. 이 논문에서는 분광학적 접근을 통해 기질인 DNA와의 상호작용에서 T4 endo V의 C-terminal region의 역할에 대한 이해를 높이고자 하였다. 이 region이 DNA와의 결합에 관여함으로써 T4 endo V가 그것의 target에 정확하게 위치하여 효소로서의 기능을 수행하도록 하는 역할을 하리라는 것을 알 수 있었다. 즉 C-terminal region이 T4 endo V의 기능 중 기질과의 결합기능에 중요하다는 것을 확인한 것이다.

한편 T4 endo V의 C-terminal region과 더불어 기질인 DNA와의 결합에 관계되는 것으로서 basic amino acid 들이 주목되어 왔다. T4 endo V의 표면상의 electrostatic potential의 molecular graphic display는 많은 positive charged residue (Arg, Lys)들이 표면 한쪽에 모여 있음을 보이는 데 이것은 이 부분이 DNA와 electrostatic interaction할 가능성을 보여 주고 있다. 현재 positive charge를 갖는 잔기들의 isotope-labeling을 통한 NMR 연구에서 DNA를 titration했을 때, 이 잔기들이 기질결합에 관여함을 시사하는 chemical shift와 line width의 변화가 관찰되었다. 이러한 결과는 계속 진행 중인 각 아미노산별의

isotope-labeling 방법에 의한 T4 endo V의 구조-기능 상관관계의 NMR 연구 진척에 기초를 제공하고 있으며, 중간 data로서 축적되고 있다. T4 endo V의 C-terminal region에 초점을 두어 진행한 이 논문의 결과는 앞의 positive charged residue의 역할에 관한 결과와 더불어 T4 endo V의 기질과의 결합양상 연구에 토대를 제공한다고 하겠다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부의 기초과학 거점연구소 연구비지원 (BSRI-94-7402) 및 과기처의 G7 구조생물학 연구비지원 (1994)에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Luria, S. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **33**, 253-264 (1947).
- 2) Earm, W. : *Virology* **19**, 66 (1963).
- 3) Yasuda, S. and Sekiguchi, M. : *Biochim. Biophys. Acta.* **442**, 197 (1976).
- 4) Nakabeppu, Y. and Sekiguchi, M. : Physical association of pyrimidine dimer DNA glycosylase and apurinic/aprimidinic DNA endonuclease essential for repair of ultraviolet-damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2742 (1981).
- 5) Nakabeppu, Y., Yamashita, K. and Sekiguchi, M. : Purification and characterization of normal and mutant form of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.* **257**, 2556 (1982).
- 6) Cleaver, J. E. : Defective repair replication of DNA in Xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652 (1968).
- 7) Tanaka, K., Sekiguchi, M. and Okada, Y. : Restoration of ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis of Xeroderma pigmentosum cells by the concomitant treatment with bacteriophage T4 endonuclease V and HVJ(Sendai virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4071 (1975).
- 8) deJong, A. J. R., Vermeulen, W., Keijzer, W., Hoeizmakers, J. H. J. and Bootsma, D. : Microinfection of *Micrococcus luteus* UV-endonuclease restores UV-induced unscheduled

- DNA synthesis in cells of 9 Xeroderma pigmentosum complementation groups. *Mutation Res.* **150**, 99 (1985).
- 9) Warner, H. R., Christensen, L. M. and Persson, M. L.: Evidence that the UV endonuclease activity induced by bacteriophage T4 contains both pyrimidine dimer-DNA glycosylase and apyrimidinic/apurinic endonuclease activities in the enzyme molecule. *J. Virol.* **40**, 204 (1981).
- 10) Morikawa, K., Matsumoto, O., Tsujimoto, M., Katayanagi, K., Ariyoshi, M., Doi, T., Ikehara, M., Inaoka, T. and Ohtsuka, E.: X-ray structure of T4 endonuclease V: An excision repair enzyme specific for a pyrimidine dimer. *Science* **256**, 523 (1992).
- 11) Doi, T., Recktenwald, A., Karaki, Y., Kikuchi, M., Morikawa, K., Ikehara, M., Inaoka, T., Hori, N. and Ohtsuka, E.: Role of the basic amino acid cluster and Glu-23 in pyrimidine dimer glycosylase activity of T4 endonuclease V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9420 (1992).
- 12) Dowd, D. R. and Lloyd, R. S.: Site-directed mutagenesis of the T4 endonuclease V gene: The role of Arginine-3 in the target search. *Biochemistry* **28**, 8699 (1989).
- 13) Schrock, R. D. III and Lloyd, R. S.: Reductive methylation of the amino terminus of endonuclease V eradicates catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **266**, 17631 (1991).
- 14) Behmoaras, T., Toulm, J. J. and Hillne, C.: Specific recognition of apurinic sites in DNA by a tryptophan-containing peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 926 (1981).
- 15) Behmoaras, T., Toulm, J. J. and Hillne, C.: A tryptophan-containing peptide recognizes and cleaves DNA at apurinic sites. *Nature* **292**, 858 (1981).
- 16) Pierre, J. and Laval, J.: Specific nicking of DNA at apurinic sites by peptides containing aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **256**, 10217 (1981).
- 17) Recinos, A. III and Lloyd, R. S.: Site-directed mutagenesis of the T4 endonuclease V gene: Role of Lysine-130. *Biochemistry* **27**, 1832 (1988).
- 18) Stump, D. G. and Lloyd, R. S.: Site-directed mutagenesis of the T4 endonuclease V gene: Role of Tyrosine-129 and -131 in pyrimidine dimer-specific binding. *Biochemistry* **27**, 1839 (1988).
- 19) Ishida, M., Kanamori, Y., Hori, N., Inaoka, T. and Ohtsuka, E.: In vitro and in vivo activities of T4 endonuclease V mutants altered in the C-terminal aromatic region. *Biochemistry* **29**, 3817 (1990).
- 20) Bong Jin Lee, Sakashita, H., Ohkubo, T., Ikehara, M., Doi, T., Morikawa, K., Kyogoku, Y., Osafune, T., Iwai, S. and Ohtsuka, E.: Nuclear Magnetic Resonance study of the interaction of T4 endonuclease V with DNA. *Biochemistry* **33**, 57 (1994).
- 21) Bong Jin Lee, Jun Seok Yu, Hyung Mi Lihm: Study on the structure of DNA containing a thymine dimer and T4 endonuclease V*DNA complex. *J. Appl. Pharm. (Seoul)* **2**, 28 (1994).
- 22) Taylor, J. S., Brockie, I. R. and O'Day, C. L.: A building block for the sequence-specific introduction of cis-syn thymine dimers into oligonucleotides. Solid-phase synthesis of TpT(c,s)pTpT. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6735 (1987).