

고농도 염에 의한 *Deinococcus radiodurans* RecA 단백질의 DNA 비의존성 ATPase 역가의 활성화

김종일

서울여자대학교 자연과학대학 식품과학부

DNA-Independent ATPase Activity of *Deinococcus radiodurans* RecA Protein Is Activated by High Salt

Jong-Il Kim

Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Republic of Korea

(Received October 6, 2010/Accepted November 23, 2010)

Deinococcus radiodurans RecA protein, when bound to DNA, exhibits a DNA-dependent ATPase. In the absence of DNA, the rate of RecA protein-promoted ATP hydrolysis drops 1,000-fold under the physiological concentrations of salt. This DNA-independent activity can be stimulated to levels approximating those observed with DNA by adding high concentrations (approximately 1.6 M) of a wide variety of salts. This effect was characterized by varying salt concentration and comparing the effects of different ion types. The higher concentrations of salt stimulated the ATP hydrolysis by RecA protein in the absence of DNA. At 1.6 M chloride, the observed stimulation showed the following cation trend $K^+ \geq Na^+ > NH_4^+$ and the following anion sequence was observed: $glutamate^- > Cl^- > acetate^- > PO_4^-$ at 1.6 M K^+ . The catalytic properties of the salt-stimulated ATP hydrolysis reaction was optimal between pH 7.0 and 8.0, which was similar to the double stranded DNA-dependent ATPase activities of *Deinococcus radiodurans* RecA protein. In the absence of DNA the active species for ATP hydrolysis by RecA protein was shown to be an aggregate of three RecA protein molecules.

Keywords: ATP hydrolysis, *Deinococcus radiodurans*, DNA-independent ATPase, high salt activation, RecA protein

*Deinococcus radiodurans*는 polyextremophile이며, 여러 형태의 심각한 DNA 손상을 효과적으로 수선하며, 특히 이온화 방사선에 대한 저항성은 대표적인 독특한 표현형이다. *D. radiodurans* recA는 이 미생물의 방사선 저항성을 나타내는 표현형에 필수적이며 DNA 재조합 수선 과정에 관여한다(8). *D. radiodurans*의 recA를 파괴하게 되면 급격한 DNA 손상으로부터 회복되는 능력이 상실되며, 적은 양의 오래 계속되는 방사능이 존재하는 조건에서 성장하는 능력이 상실된다(6, 7). RecA 혹은 RecA-like 단백질은 고세균, 진정세균, 효모, 식물 및 포유동물 등 모든 계통수에서 발견되며, 상동 DNA 접합(pairing)과 상동재조합(homologous recombination) 과정에 있어 매우 중요한 역할을 수행한다. *D. radiodurans*의 recA 유전자는 *Thermus* 종의 recA와 유사하며, *D. radiodurans*의 RecA 단백질은 *Thermus aquaticus* RecA와 69% 아미노산 서열 유

사성을 가지며, *E. coli* RecA와 비교하면 53%의 아미노산 서열 유사성을 나타낸다(7). DNA 손상에 대한 매우 강한 저항성은 유전체 분석에 의해 나타난 여러 특징들 및 유전체의 서열 분석으로는 나타나지 않는 DNA와 단백질의 구조적인 특이성 등의 통합적인 것으로 결정되는 매우 복잡한 것으로 나타난다.

RecA 단백질은 DNA 의존성 ATPase 활성을 가지며, 상동 재조합 과정 및 DNA 재조합 수선 과정에서 DNA 가닥 교환 반응을 촉매한다(3). DNA 가닥 교환반응에서 RecA 단백질은 외가닥 DNA에 결합하여 RecA nucleoprotein 필라멘트를 형성하고 선형 DNA가 접합(pairing)하게 되어 연결분자(joint molecule)가 형성되면서 분지 이동(branch migration)이 진행되어 DNA 교환반응이 일어난다. 이때 RecA nucleoprotein 필라멘트 전체에서 ATP 가수분해가 일어나 분지 이동반응을 효과적으로 일어나게 한다. ATP 가수분해가 공급되지 않은 조건에서는 효율적인 반응이 일어나지 않게 된다(2). RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해는 RecA 단백질이 관여하는 process에

* For correspondence. E-mail: jikim@swu.ac.kr; Tel: +82-2-970-5638; Fax: +82-2-970-5977

매우 중요한 역할을 담당하게 된다. 다른 세균 RecA 단백질과 마찬가지로 *D. radiodurans*의 RecA 단백질은 외가닥 혹은 이중가닥 DNA에 단량체(monomer) RecA가 연속적으로 결합하여 DNA 전체길이에 nucleoprotein 필라멘트를 형성한다. ATP (혹은 dATP)를 가수분해하며 DNA 가닥 교환반응을 촉매 한다(3). *E. coli* RecA 단백질 역시 DNA 의존성 ATPase이며, DNA에 결합하지 않은 상태에서의 DNA 비의존성 ATPase 활성은 0.001 min^{-1} 정도로 무시될 수 있다. 그러나 DNA 의존성 ATPase 활성은 DNA와 단백질의 상호작용현상 자체에 의한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다(4). 그러므로 본 연구에서는 DNA 비의존성 ATPase 활성분석을 통해 *D. radiodurans* RecA protein의 본질적인 ATPase의 특성을 확인하여 직접적인 역할 담당을 추론하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

각종 시약 및 ATP 재생 및 연결시스템(coupling system)을 구성하는 phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase, lactic dehydrogenase, NADH와 ATP는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, DEAE-Sepharose FF resin과 Bio-Gel hydroxyapatite는 BioRad (USA)에서 구입하여 사용하였다.

RecA 단백질 정제

D. radiodurans native RecA 단백질은 이 유전자가 클로닝된 pEAW158를 가지는 *E. coli* STL2669/pT7pol26 균주를 암 피실린($100 \mu\text{g/ml}$) 및 카나마이신($40 \mu\text{g/ml}$)이 함유된 LB broth에 접종한 후 37°C 에서 600 rpm에서의 흡광도가 0.5되게 4-5시간, 200 rpm 진탕 배양하였다(3). IPTG (최종농도 0.4 mM)를 첨가하여 recA 유전자 발현을 유도하고 3시간 더 배양하여 미생물 세포를 수확하였다. 세포(50 g)를 25% sucrose가 포함된 250 mM Tris-HCl (80% cation, pH 7.5) 완충용액(200 ml)에 잘 녹이고, lysozyme (1.4 mg/ml)를 첨가하여 4°C 에서 1시간 반응하였다. EDTA (10 mM 최종농도)를 첨가하고 30분간 저어주면서 반응을 한 후 초음파로 세포를 파쇄하였다. 파괴된 세포를 4°C 에서 $31,000\times\text{g}$ 로 1시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 조 추출물로 이용하였다. 조 추출물에 polymin P (최종농도 0.5% v/v)를 천천히 첨가하고 4°C 에서 30분간 저어준 후 $25,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리 하였다. 침전물을 50 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT)으로 2번 세척하고 4°C 에서 15분간 저어주면서 현탁한 후 $25,000\times\text{g}$ 로 20분간 원심 분리하여 상등액을 버리고, RecA 단백질을 용출하기 위해 최종 침전물을 200 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액으로 세척하면서 현탁하고 $25,000\times\text{g}$ 로 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. Ammonium sulfate (0.2002 g/ml)를 첨가하고 원심 분리하여 침전된 단백질을 버리고 상등액에 또 다시 ammonium sulfate (0.145 g/ml)를 첨가한 후 $25,000\times\text{g}$ 로 30분간 원심 분리하여 RecA 단백질을 침전시켰다. 침전물을

ammonium sulfate (0.377 g/ml)가 포함된 완충용액으로 세척하여 polymin P를 가능한 한 제거하고 200 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액에 잘 녹이고 투석 망에 넣어 4°C 에서 50 mM KCl이 포함된 R 완충용액에 18시간 동안 완충용액을 3회 바꾸어 가며 투석하여 ammonium sulfate를 제거하였다. 투석한 ammonium sulfate 분획물에 대해 DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. DEAE-Sepharose fast flow ($2.5\times 12 \text{ cm}$) 수지를 충전하여 50 mM KCl이 포함된 R 완충용액으로 2 ml/min의 유속으로 컬럼을 충분히 평형화시켰다. 단백질 분획물을 150 ml/h의 유속으로 장전한 후 동일 완충용액으로 결합 되지 않는 단백질이 완전히 제거되도록 흘려주었다. 수지에 결합된 단백질을 0-500 mM NaCl 농도 구배를 걸어 2 ml/min의 유속으로 총 600 ml 흘리면서 분획들을 모아 다음 과정에 이용하였다. *D. radiodurans* RecA 단백질이 포함된 분획들을 모아 350 mM P 완충용액(350 mM potassium phosphate; pH 7.5, 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 투석하고 동일한 완충용액에 평형된 Bio-Gel hydroxyapatite 컬럼 ($2.5\times 15 \text{ cm}$)에 장전하였다. 300 ml의 P (500 mM phosphate) 완충용액으로 흘려주어 RecA 단백질을 용출하였다. 순수한 RecA 단백질이 포함된 분획들을 모아 저장 완충용액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT)에 투석한 후 소량씩 나누어 -80°C 에 보관하였다. *D. radiodurans* RecA 단백질의 농도측정은 흡광계수 0.372 $A_{280} \text{ mg/ml}$ 를 이용하였다(3). *D. radiodurans* RecA 단백질의 농도는 단량체의 농도로 표시하였다.

ATPase 활성분석

D. radiodurans RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해는 발표된 방법에 의해 분석되었다(3). 모든 반응은 37°C 에서 수행되었으며, ATP 가수분해의 정도는 연결된 분광 흡도계적인 활성 분석으로 측정되었다. ATP 가수분해로 생성된 ADP는 pyruvate kinase에 의해, phosphoenolpyruvate와 ADP이 반응하여 pyruvate와 ATP로 전환되어 ATP가 재생되어 ATP의 농도가 일정하게 유지된다. Pyruvate는 lactate dehydrogenase에 의해 pyruvate와 NADH가 반응하여 lactate를 생성하며, NADH는 NAD^+ 로 전환된다. 이 전체 반응에서 생성된 ADP 양은 NADH의 소모량과 1:1 정량비적인 관계이므로 NADH의 양을 분석하는 원리로 수행되었다. NADH의 흡광도 측정은 항온수조순환장치가 연결된 큐벳장치가 부착된 Shimadzu 분광흡도계를 사용하였으며 반응혼합물은 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 mM potassium glutamate와 10 mM magnesium acetate를 포함하며 RecA 단백질, ATP 혹은 뉴클레오티드의 농도는 각각의 조건에 표시하였다. pH가 변하는 조건에서는 완충용액의 농도는 25 mM로 하였다. ATP 재생계(regenerating system)는 3 mM phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase (10 U/ml), 및 3 mM potassium glutamate로 구성되었으며, 연결계(coupling system)는 2 mM NADH와 lactate dehydrogenase (10 U/ml)로 첨가되었다. Nucleotide cofactor로 dATP가 사용될 경우 dATP 재생 및 연결계의 농도는

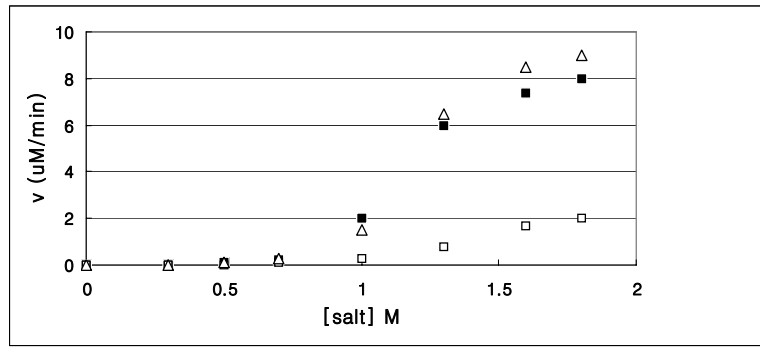


Fig. 1. Dependence of RecA protein ATPase on the concentration of various salts. Reactions were carried out at pH 7.5 with 5 μM recA protein, 2 mM ATP, and 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 5% glycerol, ATP regenerating system, coupling system and indicated salt concentrations: KCl (■), NaCl (△), and NH₄Cl (□)

pyruvate kinase (25 U/ml), lactate dehydrogenase (60 U/ml) 로 증가하여 사용하였다. ATP 가수분해 속도는 1분당 NADH의 감소량으로 측정하였으며, NADH의 정량은 NADH의 380 nm에서의 흡광도 계수 1,210 M⁻¹cm⁻¹을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

High salt-activated ATPase

D. radiodurans (Dr) RecA 단백질은 DNA 의존성 ATPase 활성을 가지고 있다. DNA 의존성 ATPase 활성은 비교적 높은 가수분해 속도를 가지며(3) 이 경우 RecA 단백질은 DNA에 결합한 DNA-단백질 복합체만이 ATPase 활성을 나타낸다. Dr RecA 단백질의 외가닥 DNA 의존성 활성은 pH가 증가함에 따라 감소하며, pH 6에서 가장 높은 활성을 보인다. 이중가닥 DNA 의존성 ATP 가수분해는 중성 pH에서는 높은 활성을 보이나 pH 8 이상에서는 비교적 낮은 활성을 보여 외가닥 DNA 의존성 활성과 확연하게 구별된다. DNA 의존성 활성에서 Dr RecA 단백질은 ATP 뿐만 아니라 dATP를 높은 활성으로 가수분해 한다(3). Dr RecA 단백질의 ATPase (혹은 dATPase) 활성의 기능적 본질적인 ATPase의 활성을 분석하기 위해 DNA cofactor가 존재하지 않는 상태의 조건에서 ATP 가수분해 반응을 실시하였다. DNA 비의존성 ATPase 활성은 저농도(0.5 M 이하)의 KCl 조건에서는 여러 범위의 pH에서 무시할 만한 정도로 나타났었다. DNA가 존재 하지 않을 때 RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해는 보다 높은 농도(1.0 M)의 KCl에 의해 촉진 되었으며 고농도의 염(1.2 M 이상) 조건

Table 1. Rate of ATP (or dATP) hydrolysis by RecA protein without DNA.

	Rate of hydrolysis (μM/min)	
	ATP	dATP
<i>E. coli</i> RecA	32	52
<i>D. radiodurans</i> RecA	3.6	9.1

Reaction mixtures contained 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 mM potassium glutamate, 10 mM magnesium acetate, ATP regenerating system, coupling system, 2.5 μM RecA, 2 mM ATP (or dATP), and 1.6 M KCl.

에서는 ATP와 dATP가 효율적으로 가수분해 되었다(Table 1). 이 조건에서 ATP 가수분해는 첨가된 RecA 단백질의 농도에 비례하여 증가하였으며, 1.6 M KCl에서 2.5 μM의 Dr RecA 단백질에 의한 ATP의 가수분해는 3.6 μM /min, dATP의 가수분해 속도는 9 μM /min로, DNA 비의존성 활성에서도 dATP가 ATP보다 더 빨리 가수 분해되고 1.6 M 염을 첨가함으로써 염에 의한 ATPase 활성이 1,000배 이상 활성화 되었다. *E. coli* RecA 단백질 역시 DNA 의존성 ATPase이며, DNA가 존재 하지 않을 때의 DNA 비의존성 ATPase 활성은 0.001 min⁻¹ 정도로 무시될 수 있으며 DNA가 존재하지 않을 때 RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해 활성이 고농도의 염에 의해 촉진된다고 보고 되었지만(8), *B. subtilis* RecA 단백질의 경우 고 농도 염에 의한 ATPase의 효소활성이 활성화 되지 않는 것으로 보고 되었다(9). DNA가 존재하지 않는 상태에서, DNA에 결합되지 않은 형태의 RecA 단백질은 이러한 능력이 불활되어 있는 상태이며, 고농도의 염을 첨가하게 되면 ATP를 가수분해하는 능력이 활성화되어 DNA에 결합되지 않은 형태의 RecA 단백질이라도 DNA에 결합한 형태의 RecA 단백질 구조로 전환되어 ATP를 가수분해하는 활성을 가지게 된다. Dr RecA 단백질의 본질적인(intrinsic) ATPase 활성이 salt에 의해 활성화 되었으며, 1.6 M KCl, pH 7.5에서의 2.5 μM RecA의 활성화 정도는 외가닥 DNA 의존성 ATPase의 활성(k_{cat}=7.5 min⁻¹)의 20-30% 정도 촉진되었으며 활성화되는 정도는 첨가되어진 염의 농도에 따라 다르며 더 높은 염 농도에서 더 많이 활성화되었다. 염 농도의 영향은 농도가 증가함에 따라 일직선상으로 증가하지 않고 S자 형태(sigmoid)의 형태를 보여(Fig. 1) ATP 가수분해 역가의 활성화를 위해 최소한 어느 정도의 염이 존재해야 된다는 것을 의미한다. 세포 내의 생리화학적 조건이 아닌 높은 염농도에서 RecA 단백질이 DNA와 상관없이 ATPase 활성을 갖는 것은 DNA에 결합하여 ATP를 분해하는 단백질의 구조와 DNA에 결합하지 않은 RecA 단백질의 구조가 다르며, 높은 염농도에서 RecA 단백질은 DNA에 결합하지 못하는 상태이므로 염에 의한 구조전이(structural transition) 현상이 유도 되어 효소활성이 촉진될 수 있다는 것을 의미한다.

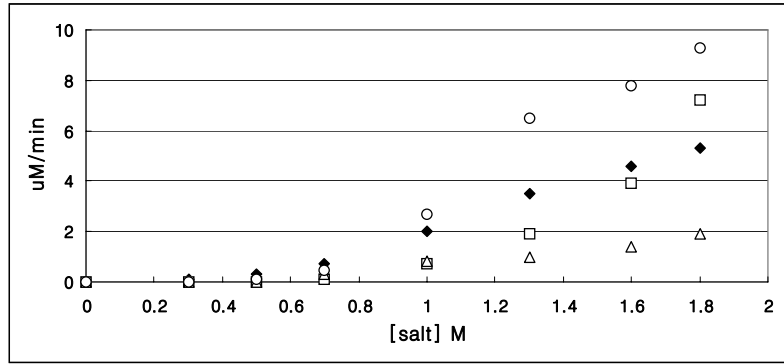


Fig. 2. Dependence of RecA protein ATPase on the concentration of various salts. Reactions were carried out at pH 7.5 with 5 μM recA protein, 2 mM ATP, and 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 5% glycerol, ATP regenerating system, coupling system and indicated salt concentrations: K-glutamate (○), K-acetate (□), KPO_4 (△), and Na-acetate (◆)

염 종류에 의한 영향

Dr RecA 단백질의 DNA 의존성 ATPase 활성은 1가 이온 (monovalent ion)에 의해 억제되는 것이 관찰되며, 0.1-0.5 M 농도의 범위에서 염의 농도가 증가하면 더 많이 억제를 받는다. 억제되는 정도는 염의 이온 형태에 따라 다른 정도로 억제된다(4). 이러한 염의 농도 및 이온의 형태에 따른 활성화 정도를 DNA에의 결합이 배제된 조건인 DNA가 존재하지 않는 조건의 DNA 비의존성 ATPase 활성을 측정하였다. 1.8 M 농도의 염이 존재할 때 5 μM RecA 단백질에 의한 ATP의 가수분해는 KCl이 존재할 경우 8 $\mu\text{M}/\text{min}$, K-acetate의 경우 7.1 $\mu\text{M}/\text{min}$, NaCl의 경우 9.0 $\mu\text{M}/\text{min}$ 의 속도로 일어났으며, 염의 이온종류(NaCl, KCl, K-glutamate 등)를 달리하였을 때의 가수분해속도는 각각 달리 나타났으며 ATPase의 고농도 염에 의한 활성화 현상은 마찬가지로 관찰되었다(Figs. 1 and 2). NH_4Cl 이 존재할 때의 가수분해속도는 2 $\mu\text{M}/\text{min}$ 로 훨씬 적은 정도의 활성화가 관찰된다(Fig. 1). 염에 의한 활성화 현상은 같은 이온세기에서 서로 다른 종류의 염들에 의한 활성화 정도가 다르게 촉진되므로 일반적인 염의 세기(ionic strength)에 의

한 효과에 의한 것으로는 판단되지 않는다. 1.6 M Cl 음이온이 존재할 때 양이온의 형태에 따른 활성화 정도는 $\text{K}^+ \geq \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+$ 의 경향을 보였으며 (Fig. 1), 1.6 M의 K 양이온 존재할 때 음이온의 형태에 따른 활성화는 $\text{glutamate} > \text{Cl}^- > \text{acetate} > \text{PO}_4^-$ 의 순서로 높게 나타났다(Fig. 2). 염이 단백질에 직접적이며 포괄적 결합을 통하거나 혹은 단백질 용액에서 용매에 대한 직·간접적인 작용을 통한 염의 단백질 성질에 대한 효과는 많이 보고되었으며(1), 단백질의 용해도, 수화 정도 등의 단백질 성질이 특별한 이온에 의한 영향의 정도가 다르게 순차적인 효과가 나타나서 Hofmeister 서열에 따라 활성화 정도가 나타난다고 판단된다. Glutamate 이온의 경우 단백질구조의 3차적인 부분(domain)에서 선택적인 우호성을 가지고 배제되므로 보다 많은 양의 물 분자가 단백질에 수화될 수 있다.

pH 영향

고농도의 염이 존재하는 조건에서 DNA 비의존성 ATPase의 활성화에 대한 pH의 영향을 분석하였다. pH 5.5에서는 최대속도의 반 정도로 ATP를 가수분해하였으며 pH가 증가함에 따라 점진적인 속도의 증가현상이 나타나며 비교적 넓은 범위 최적 조건인 pH 7과 pH 9 사이에서 최대 활성을 보였다(Fig. 3). RecA 단백질이 외가닥 DNA에 결합하였을 때의 ATP 가수분해 활성은 pH 6에서 최대속도로 분해하며 pH가 증가함에 따라 ATPase의 활성이 감소하였다(3, 5). 이중가닥 DNA 의존성 활성은 pH 6이상일 때 ATP 가수분해가 일어나며 pH가 증가함에 따라 ATPase의 활성이 증가하여 pH 7과 pH 9 사이에서 최대 활성을 가져 넓은 범위의 pH 최적조건을 보인다(4). DNA 의존성 활성과 DNA 비의존성 ATPase의 활성을 비교하면 ATP 가수분해에 미치는 pH의 영향은 DNA 비의존성 ATPase 활성은 이중가닥 DNA 의존성 활성의 형태와 유사한 것으로 나타났다.

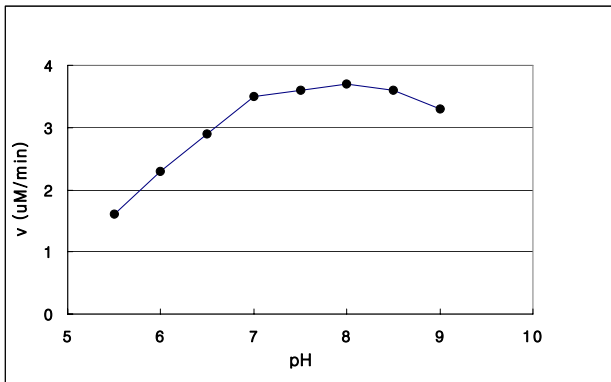


Fig. 3. Effects of pH on the hydrolysis of ATP by the RecA protein. Reactions were carried out at pHs with 1.6 M KCl, 2.5 μM RecA protein, 2 mM ATP, and 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 5% glycerol, ATP regenerating system and coupling system.

ATP 농도의 영향

pH 7.5에서 DNA가 존재하지 않는 상태에서, 고농도(1.6 M)의 염이 존재하는 조건에서 ATP를 가수분해하는 속도를

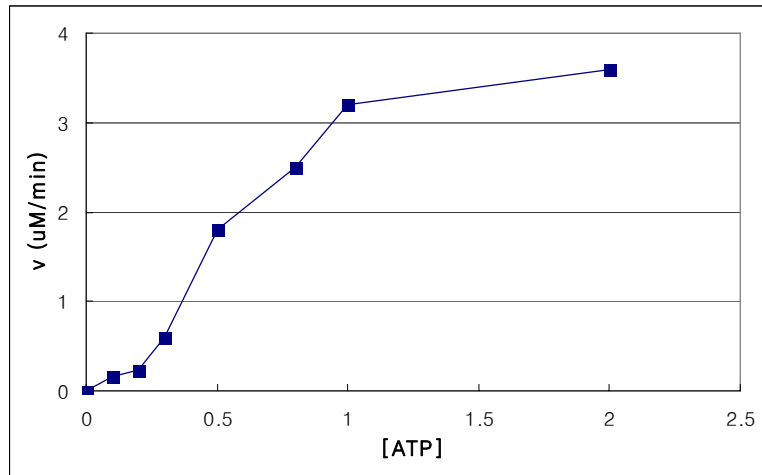


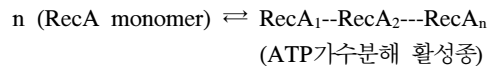
Fig. 4. Effects of ATP concentration on the hydrolysis of ATP by the RecA protein. Reaction mixture contained 1.6 M KCl, 2.5 μ M RecA protein, 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 10 mM magnesium acetate, ATP regenerating system, coupling system and the indicated concentration of ATP.

ATP 농도를 달리하여 측정하였을 때 가수분해 속도는 전형적인 Michaelis-Menten 형태를 따르지 않고 낮은 농도(0.3 mM)의 기질(ATP)에서 낮은 속도(0.2 μ M/min)로 ATP를 가수분해하고 비교적 높은 농도(0.5 mM 이상)가 존재할 때는 협동적인 현상을 보여 가수분해의 속도가 점차 증가하는 S자 형태 (sigmoid)의 형태를 보였다(Fig. 4). ATP 가수분해의 속도가 2 mM 이상의 농도에서는 더 이상 증가하지 않는 포화현상을 보인다. DNA 의존성 ATPase 활성은 이전 연구에서 분석되어 특성화 되었다(3). 이중가닥 DNA 의존성 활성은 외가닥 DNA의 의존성 활성보다 높게 나타나며 기질 ATP 농도 의존성은 비교적 포물선(hyperbolic) 형태이나 외가닥 DNA 의존성 활성은 전형적인 S자 형태(sigmoid)의 형태를 보였다. 포화속도의 절반에 해당하는 속도를 나타내게 하는 기질의 농도인 $S_{0.5}$ 의 값이 외

가닥 DNA 의존성일 때 1.2(\pm 0.2) mM로 이중가닥 DNA 의존성($S_{0.5}$ 는 약 0.6 mM) 보다 비교적 높게 나타난다. $S_{0.5}$ 의 값은 약 0.6 \pm 0.1 mM로 기질에 대한 친화도면에서 외가닥 DNA 의존성 활성보다는 이중가닥 DNA 의존성 활성형태를 보였다. *D. radiodurans*의 RecA 단백질의 DNA 의존성 활성은 이중가닥 DNA 의존성 활성이 기능적인 면에서 중요하다고 분석되었으므로 *D. radiodurans*의 RecA 단백질의 본질적인 ATPase의 활성은 이중가닥 DNA 의존성과 유사하다고 판단된다.

활성 종(Active species determination)

DNA가 존재하지 않는 상태에서, 저농도의 염 조건에서 Dr RecA 단백질의 형태는 단량체(monomeric) 형태와 몇 개의 RecA 단백질이 결합되어 있는 과량체 형태(oligomeric form)의 혼합물 존재하고 ATP (dATP)를 가수분해하는 능력이 불활되어 있다. DNA 결합 형태의 RecA 단백질은 nucleoprotein 필라멘트 형태로 RecA 단백질이 DNA 길이전체에 RecA 단백질 monomer가 end-to-end로 polymerization되어 결합되어 있어 이 형태가 ATP (dATP)를 가수분해하는 active species로 존재한다. DNA가 존재하지 않는 상태에서, 고농도의 염이 존재하는 조건에서 (d)ATP를 가수분해하는 최소한의 활성 종(active species)을 분석하기 위해 Dr RecA 단백질의 농도를 달리하여 고농도의 염에 의해 활성화 되는 (d)ATPase 활성을 측정하였다.



다량체의 형태만이 ATP를 가수분해하는 촉매능이 있다고 하면 ATP 가수분해속도는 RecA 단백질 다량체의 농도의 n승에 비례하게 된다. 평형식으로 표시 되어 질 수 있는 관계식에서 n을 결정하기 위해 RecA 단백질의 농도와 그 농도에서의 (d)ATP hydrolysis 속도를 log 가수분해속도 대 log RecA 단백질 농도를 단량체 기준으로 plot하여 그 기울기로 n을 분석

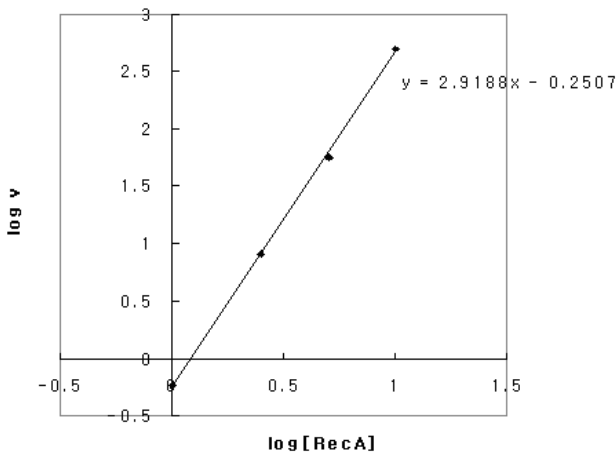


Fig. 5. Effect of Dr RecA protein concentration on the rate of (d)ATP hydrolysis. Reaction mixture contained 1.6 M KCl, 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 10 mM magnesium acetate, 2 mM ATP, ATP regenerating system, coupling system and the indicated concentration of Dr RecA protein.

하였다(Fig. 5). Dr RecA 단백질의 경우 DNA 비의존성 (d)ATPase의 활성은 최소한 3개의 RecA 단백질 monomer가 결합되어 있는 trimeric form의 과량체 상태가 요구되어진다는 것을 의미한다. 하나의 RecA 단량체의 DNA 결합부위의 크기는 3개의 nucleotide를 차지하게 되므로 이중가닥 DNA의 경우 1 helical turn을 구성하는 길이의 RecA 단백질 과량체 (oligomer)가 (d)ATP를 가수분해하는 최소길이의 활성 중으로 작용한다는 것을 의미한다.

적요

D. radiodurans RecA 단백질은 DNA에 결합한 DNA-단백질 복합체만이 ATPase 활성을 나타내며. 보통의 낮은 염 농도 조건에서는 DNA가 존재하지 않으면 RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해는 거의 일어나지 않았으나 이러한 ATP 가수분해현상은 높은 농도의 염을 첨가하게 되면 1,000배 활성화 되었으며 1.6 M KCl이 존재할 때 ATP 혹은 dATP를 가수분해 하였다. DNA가 존재하지 않을 때 염에 의해 촉진되는 활성은 RecA 단백질 농도에 비례하였고, 더 높은 염농도에서 더 높은 ATP 가수분해 활성이 나타났다. 이러한 활성화 현상을 다양한 종류의 이온 형태에서 분석하였을 때 1.6 M Cl 음이온이 존재할 때 양이온의 형태에 따른 활성화 정도는 $K^+ \geq Na^+ > NH_4^+$ 의 경향을 보였으며, 1.6 M의 K 양이온 존재할 때 음이온의 형태에 따른 활성화는 $glutamate > Cl^- > acetate > PO_4^-$ 의 순서로 높게 나타났다. 고농도의 염이 존재하는 조건에서 DNA 비의존성 ATPase의 활성은 비교적 넓은 범위 최적 조건인 pH 7과 pH 8 사이에서 최대 활성을 보였고, 기질에 대한 친화도 면에서도 외가닥 DNA 의존성 활성보다는 이중가닥 DNA 의존성 활성형태를 보였다. 고농도의 염이 첨가되고 DNA가 존재하지 않을 때 RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해를 위한 RecA 단백질의 활성 중 형태는 최소 3개의 RecA 단백질이 결

합되어 있는 과량체로 작용하는 것으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 2009학년도 서울여자대학교 자연과학연구소의 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

참고문헌

1. Arakawa, T. and S.N. Timasheff. 1990. Preferential interactions determine protein solubility. *Biochemistry* 29, 1914-1923.
2. Bedale, W.A. and M.M. Cox. 1996. Evidence for the coupling of ATP hydrolysis to the final (extension) phase of RecA protein-mediated DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* 271, 5725-5732.
3. Kim, J.I., A.K. Sharma, S.N. Abbott, E.A. Wood, D.W. Dwyer, A.Jambura, K.W. Minton, R.B. Inman, M.J. Daly, and M.M. Cox. 2002. RecA Protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: Expression, purification, and characterization. *J. Bacteriol.* 184, 1649-1660.
4. Kim, J.I. 2006. Analysis of double stranded DNA-dependent activities of *Deinococcus radiodurans* RecA protein. *J. Microbiol.* 44, 508-514.
5. Kim, J.I. 2007. Characterization of single stranded DNA-Dependent ATPase activities of *Deinococcus radiodurans* RecA protein. *Kor. J. Microbiol.* 43, 250-255.
6. Minton, K.W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* 13, 9-15.
7. Minton, K.W. 1996. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat. Res.* 363, 1-7.
8. Pugh, B.F. and M.M. Cox. 1988. High salt activation of RecA protein ATPase in the absence of DNA. *J. Biol. Chem.* 263, 76-83.
9. Steffen, S.E. and F.R. Bryant. 1999. Reevaluation of the nucleotide cofactor specificity of the RecA protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 274, 25990-25994.