

*Chlamydomonas reinhardtii*에서 순화한 Endonuclease의 특성과 Polyamine의 영향

金 載 潤 · 李 舜 熙 · 姜 濱 求 · 金 榮 敏 · 金 明 苑*

(연세대학교 이과대학 생물학과, *문리대학 생물학과)

Characterization of and Polyamine Effect on Endonuclease from Zygotes of *Chlamydomonas reinhardtii*

Kim, Jae Yoon, Sun Hi Lee, Bin G. Kang,
Young Min Kim and Myeong Won Kim*

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and

*Department of Biology, Yonsei University, Wonju)

ABSTRACT

We have purified and characterized a deoxyribonuclease from zygotes of the eukaryotic green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* and investigated effects of the polyamines, putrescine, spermidine and spermine on the purified endonuclease-catalyzed cleavage of plasmid DNA. The enzyme has a molecular weight of about 37 kDa as measured by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. There is no requirement for a divalent cation. The activity is sensitive to ionic strength, as NaCl and KCl result in inhibition. The cleavage of plasmid DNA by the purified endonuclease was effectively inhibited by polyamines. The enzyme activity was inhibited more effectively by spermine than by spermidine. The inhibition by putrescine was lower than the other two polyamines.

서 론

Isogamous 단세포성 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*는 염색체 유전인자의 모성유전에 대한 모델로 많은 연구가 이루어지고 있다. *Chlamydomonas*의 자성 배우체와 웅성 배우체가 접합하여 접합체를 이룬 후에는 웅성의 염색체 DNA의 우선적인 파괴가 일어나는데 반하여, 자성의 염색체 DNA는 접합체 형성 이후 시기에 안정된 상태로 유지된다. 이와 함께 또 다른 특이한 현상은 파괴되는 웅성의 염색체 DNA에는 methylation이 거의 없거나 있으나 자성의 염색체 DNA에는 많은 methylation이 일어난다는 점이다(Burton *et al.*, 1979). 이러한 현상은 Sager에 의해서 처음 발견되었으며(Sager, 1954), 이것을 비멘델성 유전 현상인 세포질 유전인자인 모성유전이라고 기술하였다.

본 연구는 1989년도 문교부 기초과학 연구소 학술 연구조성비 지원에 의한 것이다.

그후 Sager는 이러한 염색체 DNA의 모성유전에 세균의 modification-restriction 가설을 도입하여 이 모성유전에 염색체 DNA의 특정 염기서열을 인지하는 제한효소가 관여할 것이라고 가정하였다(Sager and Lane, 1972). 그러나, 지금까지 염색체 DNA의 methylation에 관여할 것으로 보이는 methyltransferase는 발견되었으나(Sano and Sager, 1980), 웅성의 염색체 DNA의 파괴에 관여할 것으로 보이는 제한효소가 아직까지 발견되지 못하였다. 이러한 상황에서, 최근 염색체의 모성유전을 해상력이 높은 형광현미경을 이용하여 육안으로 염색체 DNA의 모성유전 양상을 관찰할 수 있었으며(Kuroiwa *et al.*, 1982), "the coupled endonuclease-exonuclease"라는 새로운 가설이 제안되었다(Ogawa and Kuroiwa, 1983, 1985a, b, c). 이 가설은 접합체 형성시 일시적인 세포내의 Ca²⁺의 증가(Bloodgood and Levin, 1983)에 의해서 활성화된, 일명 "Nuclease C"가 그 endonuclease의 작용에 의해 환상의 염색체 DNA를 선상의

DNA 절편으로 절단시키고 그 이후의 exonuclease 기능에 의해 염록체 DNA를 파괴시킬 수 있다는 가설이다. 그러나, 이 가설은 자성의 염록체 DNA의 methylation과 nuclease C와의 상호연관성이 뚜렷하지 않다는 것이 미비한 점이라 하겠다. Transcriptional, translational inhibitors와 UV 조사에 의한 실험결과에 의하면 염록체 DNA의 모성유전에 관여할 물질이 자성의 핵에서 유도될 것으로 보고되고 있다 (Kuroiwa *et al.*, 1983a, b; Nakamura *et al.*, 1988).

Polyamine은 세포의 성장과 증식에 필요한 화합물(Jänne *et al.*, 1978; Tabor and Tabor, 1984)로 알려져 있는데, 세포 성장에 polyamine이 관여하는 기작은 일반적으로 DNA의 음전하를 띤 인산기에 양전하성의 polyamine이 결합하여 DNA를 중성화시켜 세포내에서의 DNA의 packing과 folding을 더욱 용이하게 만들기 때문이라고 보고 되었다(Krasnow and Cozzarelli, 1982). Polyamine이 DNA와 직접적으로 상호작용하는 것 이외에 polyamine은 DNA gyrase(Gellert *et al.*, 1976), DNA polymerase(Schekman *et al.*, 1972; Geider and Kornberg, 1974), polynucleotide ligase and kinase(Rae *et al.*, 1975; Lillehaug and Kleppe, 1975)의 활성화에도 영향을 주는데, 최근에는 polyamine이 DNA에 대한 제한효소의 절단 속도와 정확성을 더 높여 준다는 보고(Pingoud, 1985)도 있으며, 이와 반대로 제한효소의 활성을 억제한다는 보고도 있다(Kuosmanen and Pösö, 1985). 이러한 사실들은 polyamine이 DNA의 구조를 DNA metabolism에 관여하는 일단의 효소반응에 용이한 구조로 변화시킴으로써 나타날 수도 있으며, 또한 DNA 구조를 endonucleolytic cleavage에 적당하지 않은 구조로 변화시킴으로써 나타날 수 있는 것으로 추측할 수가 있다. 본 실험은 위의 여러 가지 사실에 근거를 두고 *Chlamydomonas reinhardtii*의 접합체에서 endonuclease를 순화하여 그 특성을 밝혀내었으며, 또한 polyamine이 이 효소의 활성화에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료. *Chlamydomonas reinhardtii*의 strain 21 gr (mating type plus)와 strain 5177D(mating type minus)는 미국의 Duke 대학에서 분양받아 사용하였다.

배양. *Chlamydomonas reinhardtii*의 stock culture 및 영양생장기, 배우체시기, 접합체시기로의 유도, 배양은 R. Sager의 방법을 변형한 Snell(1982)의 방법을 사용하였고 이 방법에 의해 유도된 접합체를 시료로 사용하였다. 배양장치로는 공기 공급기와 여과장치가 연결된 플라스크를 사용하였다.

완충용액의 조제. 완충용액 A는 10 mM Tris-HCl(pH 7.9), 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl로 조성되었고 사용하기 직전에, 완충용액 A에 50 µg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF)를 첨가시켰다. 완충용액 B는 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 7 mM 2-

mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol로 조성하였으며, 완충용액 C는 10 mM potassium phosphate(pH 7.4), 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol로 조성하였다. 완충용액 D는 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 7 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5 M NaCl로 조성하였다.

Plasmid DNA의 정제. Unmethylated pYK322 plasmid DNA는 *E. coli* strain GM119(*dam*, *dcm*)를 pYK322 plasmid DNA를 이용하여 형질전환시킨 후에 배양시켜 plasmid DNA를 alkaline lysis 방법으로 분리, 정제하였다(Maniatis *et al.*, 1982). *E. coli* TB 1(pYK322)은 미생물학 연구실(연세대)에서 균주를 분양받았다.

Heparin-agarose의 제조. CNBr으로 활성화된 sepharose 6B에 heparin을 붙여서 heparin-agarose를 제조하였다(Pirrota and Bickle, 1980).

효소활성의 확인. 10배 농도의 반응완충용액 [200 mM Tris-HCl(pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol] 2 µl, 400 ng의 unmethylated pYK322 plasmid와 3-5 µl의 효소액을 섞고 총 반응액이 20 µl가 되도록 증류수를 더하였다. 이 반응용액을 37°C에서 1시간 반응시키고 4 µl의 반응정지용액(20% Ficoll 400, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 1.0% SDS, 100 mM EDTA)을 섞어준 후 TBE 완충용액[89 mM Tris-HCl(pH 8.0), 89 mM boric acid, 2 mM EDTA]에서 0.8% agarose gel로 전기영동하였다. 이 때 전압은 약 11 V/cm이었다. 전기영동이 끝난 gel을 ethidium bromide용액(1 µg/ml)에서 15분간 염색하고, 흐르는 물에 20분간 탈색시킨 뒤에 자외선을 조사(Ultraviolet products Inc., UV transilluminator)하여 DNA 절단양상을 관찰함으로써 효소의 활성을 확인하였다.

단백질의 정량. Bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 Lowry(1951) 방법에 의하여 단백질의 양을 비색 정량하였다.

효소 1단위 정의. 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM MgCl₂와 1 mM 2-mercaptoethanol로 이루어진 반응용액에 400 ng의 unmethylated pYK322 plasmid를 37°C에서 1시간 반응시켰을 때, plasmid DNA를 완전히 절단시킬 수 있는 효소의 양을 효소 1단위라고 정의하였다.

Endonuclease의 순화. 27.5g의 *Chlamydomonas reinhardtii* 접합체를 4 ml/g·cell이 되도록 완충용액 A에 현탁시키고 초음파 분쇄장치(Lab Line Instrument Inc.)를 이용하여 120-140 watt로 20초간 20회에 걸쳐 초음파 파쇄하였다. 이 파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 30분, 4°C)하고 상정액을 다시 초원심분리(Beckman, LR-50B, Ultracentrifuge, 25,000 rpm, 90분, 2°C)하여 침전물을 제거하고 상정액을 얻었다(Crude extract, Fraction I; 91 ml). 이하의 모든 과정은 0-4°C에서 실시하였다. Fraction I을 자성막대기로 천천히 저어 주면서 최종 농도가 1%가 되도록 10% (v/v) polyethyleneimine을 넣고 1시간 더 저어준 후, 이

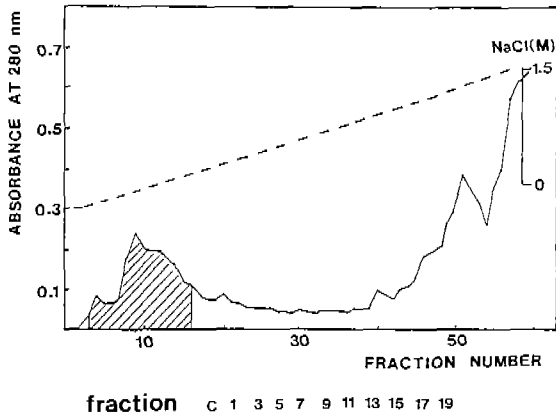


Fig. 1. Elution profile of the endonuclease on a neoparnagarose column. The enzyme activity was measured by agarose gel electrophoresis (below). Symbols: absorbance at 280 nm (—), NaCl gradient (---).

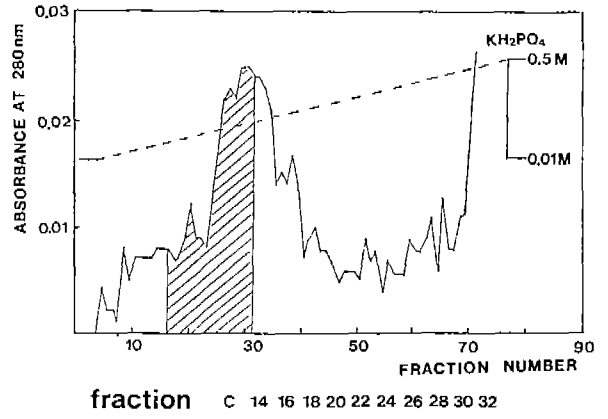


Fig. 3. Elution profile of the endonuclease on a hydroxylapatite column. The enzyme activity was measured by agarose gel electrophoresis (below). Symbols: absorbance at 280 nm (—), KH_2PO_4 gradient (---).

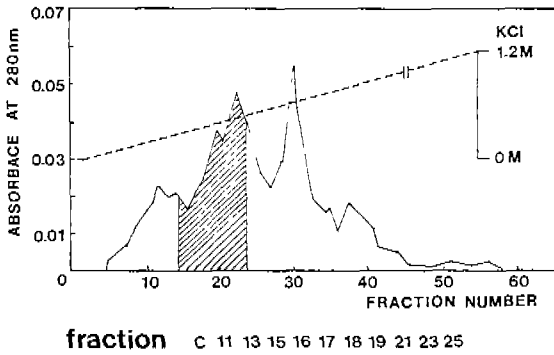


Fig. 2. Elution profile of the endonuclease on a phosphocellulose column. The enzyme activity was measured by agarose gel electrophoresis (below). Symbols: absorbance at 280 nm (—), KCl gradient (---).

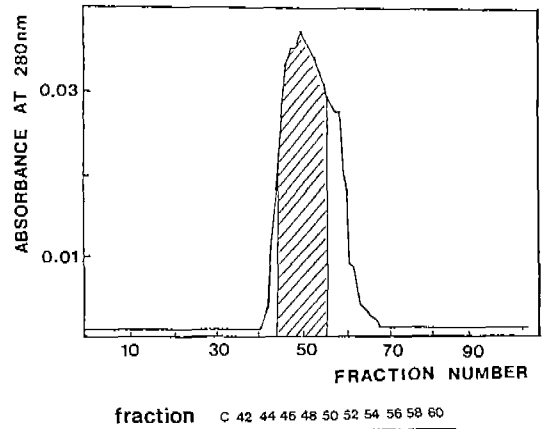


Fig. 4. Elution profile of the endonuclease on a sephadex G-150 gel column. The enzyme activity was measured by agarose gel electrophoresis (below). Symbols: absorbance at 280 nm (—).

용액을 원심분리(12,000 rpm, 20분 2°C)하여 핵산을 제거하고 상침액만을 얻었다(Fraction II; 100 ml). Fraction II를 자성막대로 천천히 저어주면서 ammonium sulfate를 첨가하여 75% 포화용액을 만들고 1시간 더 저어준 후 이 용액을 원심분리(12,000 rpm, 30분 2°C)하여 침전물을 얻고 그 침전물을 20 ml의 완충용액 B에 녹인 후 4 liter의 완충용액 B에 12시간 투석하였다(Fraction III; 19 ml). Fraction III을 완충용액 B에 5배 희석시킨 후, 이것을 완충용액 B에 미리 평형이 이루어진 heparin-agarose column(2.2×15 cm)에 11 ml/h의 속도로 적용시켰다. 흡광도가 0이 되도록 완충용액 B로 column을 씻어 준 뒤, 0-1.5 M NaCl 농도구배를 갖는 완충용액 B 300 ml로 용출하였다. 이때 효소활성이 있는 fraction을 모아서 4 liter의 완충용액 C에 12시간 투석하였다(Fraction IV; 69 ml). Fraction IV를 완충용액 C로 미리 평형이 이루어진 phospho-cellulose column(2.2×20 cm)에 30 ml/hr의 속도로 적용한 후 0-1.2 M KCl 농도구배를 갖는 완충용액 C 500 ml로 용출시켰다. 다시 효소의 활성이 있는 fraction을 모아 4 liter의 완충용액 C에 12시간 투석하고(Fraction V; 40.5 ml) Fraction V를 완충용액 C에 미리 평형이 이루어진 hydroxylapatite column(1.7×15 cm)에 적용시켰다. 효소활성이 있는 fractions(Fraction VI; 31.5 ml)을 모은 후, Fraction VI를 PM-10 ultramembrane filter를 이용하여 농축시키고, 농축된 효소액을 다시 1 liter의 완충용액 D에 12시간 투석하였다. 농축된 효소액을 완충용액 D로 미리 평형이 이루어진 sephadex G-150 column(1.3×70 cm)에 적용하였으며, 이 때 15 cm H₂O의 정수압을 적용시켰다. 효소의 활성이 있는 fractions를 모아 1 liter의 완충용액 B에 12시간 투석하여 최종 효소원으로 사용하였다(Fraction VII; 12.5 ml).

순화된 효소의 분자량. 효소의 분자량은 sephadex G-150 column(1.3×70 cm)을 이용한 gel filtration(Andrew, 1964) 방법으로 측정하였다. Void volume는 blue dextran 2000으로 측정하였으며, 분자량을 알고 있는 표준 단백질로는 alcohol dehydrogenase(150 kDa), BSA(66 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa)와 cytochrome C(12.4 kDa)를 사용하였다. Column에서 용출된 blue dextran 2000은 540 nm의 흡광도, 표준 단백질은 280 nm의 흡광도를 측정하여 void volume(V_0)와 표준단백질의 elution volume(V_e)를 결정하였다. 측정된 결과로부터 계산된 V_e/V_0 에 따라 표준곡선을 그린 후 이 곡선에 의해 효소의 분자량을 결정하였다. 효소의 소단위수는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 결정하였다.

pH, 온도와 염의 농도변화에 따른 효소활성의 변화. 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol과 400 ng의 unmethylated pYK322 plasmid, 1단위의 효소가 포함된 반응용액이 37°C에서 1시간 반응한 것을 표준반응 조건으로 하고 이 반응 중에서 pH, 반응 온도와 염의 농도를 변화시키면서 효소의 활성변화를 조사하였다. pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 4.5, 5.0, 5.5

에서는 20 mM sodium acetate 완충용액, pH 6.0, 6.5, 7.0 7.5에서는 20 mM phosphate 완충용액, pH 8.0, 8.5, 9.0에서는 20 mM Tris-HCl 완충용액, pH 9.5, 10.0에서는 20 mM carbonate-bicarbonate 완충용액을 사용하였다. 온도의 영향은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 55°C로 반응온도를 변화시키면서 효소의 활성변화를 조사하였다. 염의 영향은 NaCl과 KCl을 각각 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mM로 변화시키면서 효소의 활성변화를 조사하였다.

효소반응에 미치는 2가 양이온과 sulfhydryl compound의 영향. 2가 양이온에 대한 영향은 금속이온이 전혀 포함되지 않은 경우와 표준반응 조건에서 금속이온을 각각 1 mM과 10 mM의 Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Cd⁺⁺, Co⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺과 Zn⁺⁺을 넣었을 때의 효소활성의 변화를 조사하였다. Sulfhydryl compounds의 영향을 알아보기 위하여 dithiothreitol(DTT)과 2-mercaptoethanol을 각각 0, 1, 3, 5, 7, 9 mM씩 넣어서 효소활성의 변화를 조사하였다.

Polyamine의 영향. 효소반응 용액에 중성화시킨 putrescine, spermidine, spermine을 각각 6 μM-50 mM까지 농도별로 처리하여 효소활성의 변화를 조사하였다.

결 과

Endonuclease의 순화. 27.5g의 *Chlamydomonas reinhardtii*의 접합체를 초음파 파쇄하여 얻어진 crude extract에서 PEI와 ammonium sulfate를 처리하여 분획시킨 분획물을 heparin-agarose column chromatography에 적용시켰을 때, Fig. 1에서와 같이 endonuclease는 0.06-0.4 M NaCl 농도구간에서 용출되었으며, 이 단계에서 대부분의 nuclease가 제거되었다. 3번에서 16번까지 14개의 fractions를 모은 다음 phospho-cellulose column chromatography를 수행한 결과, Fig. 2와 같이 나타났으며 효소의 활성은 0.12-0.24 M KCl 농도구간에서 용출되었다. 효소의 활성이 나타난 14번에서 22번까지의 9개의 fractions를 모은 뒤 hydroxylapatite column에 적용시켰다. 이 때 효소는 Fig. 3에서와 같이 0.09-0.19 M phosphate 완충용액의 농도구간에서 용출되었으며, 효소의 활성은 18-29번 fractions에서 나타났다. 이 효소의 활성이 나타난 fractions를 다시 모아 보다 더 순화시키기 위해서 Fig. 4에서와 같이 sephadex G-150 gel filtration에 의해 endonuclease를 분리하였으며, 이 때 endonuclease는 45-55번 fractions에서 용출되었다. 각 순화단계에서의 정량적인 순화과정은 Table 1에 나타나 있다.

순화된 효소의 특성. Sephadex G-150 gel filtration을 사용하여 몇 가지 표준 단백질의 분자량과 비교하여 순화된 효소의 분자량을 측정한 결과는 Fig. 5와 같으며 효소의 분자량은 약 37 kDa로 밝혀졌다. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 방법을 이용하여 몇 가지 표준단백질의 분자량과 비교함으로써 순화된 효소의 소단위류 측정된 결과는 Fig. 6

Table 1. Purification of the endonuclease from *Chlamydomonas reinhardtii* zygotes

	Total protein ^a (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Crude extract	1269.5	N.D. ^b	—	—	—
PEI	1172.0	N.D.	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	1060.4	N.D.	—	—	—
Heparin-agarose	47.3	12420	262.6	100	1
Phospho-cellulose	7.5	10384	1384.5	83.6	5.27
Hydroxylapatite	5.8	9856	1699.3	79.35	6.47
Sephadex G-150	0.97	4362	4495.0	35.1	17.12

a : Lowry method. b : not determined.

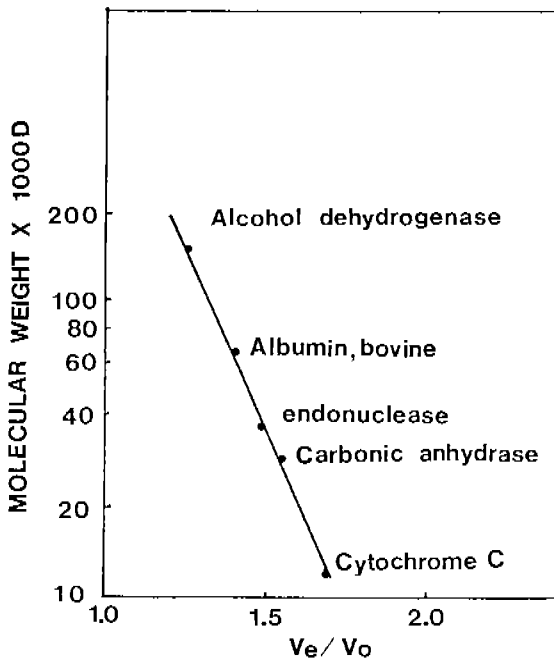


Fig. 5. Determination of molecular weight by Sephadex G-150 gel filtration. Molecular weight of the endonuclease was determined from a plot of ratio of elution volume (V_e) to void volume (V_o) of the Sephadex G-150 column (1.3×70 cm) vs. log. molecular weight for reference proteins of known molecular weight.

과 같았으며, 순화된 효소는 37 kDa의 monomer로 밝혀졌다. 순화된 효소는 Fig. 7A에서처럼 pH 4.5-6.5 사이에서 높은 효소활성을 나타내었으며, pH 9.5 이상의 pH에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다. 반응의 최적온도는 Fig. 7B에서와 같이 37°C로 나타났으며, NaCl과 KCl은 Fig. 8에서와 같이 효소활성에 필요치 않았고, Fig. 9에서와 같이 효소활성에 cofactor로써 금속 2가 양이온을 요구하지 않았으며 또한, sulfhydryl compounds도 효소의 활성에 아무런 영

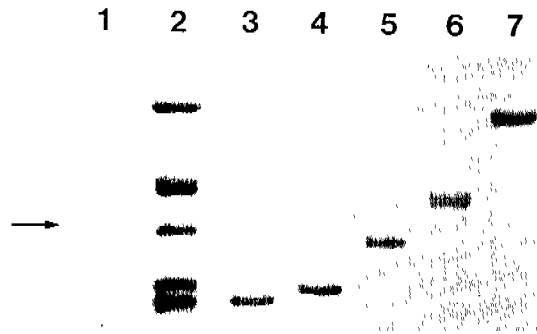


Fig. 6. The migration pattern of endonuclease from *Chlamydomonas* on 10% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.4% sodium dodecyl sulfate. Symbols; (1) purified endonuclease, 2) (3) + (4) + (5) + (6) + (7), (3) trypsinogen (24 kDa), (4) carbonic anhydrase (29 kDa), (5) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), (6) ovalbumin (45 kDa), (7) BSA (66 kDa).

향을 주지 않았다. 중성화시킨 putrescine, spermidine과 spermine을 각각 여러 농도구간으로 처리한 결과는, Fig. 10-12에서 처럼 putrescine은 25-50 mM, spermidine은 6.25-12.5 mM 그리고 spermine의 경우는 0.78-1.56 mM 사이와 각각 그 이상의 polyamine 농도에서 완전히 효소활성이 억제되었다.

고 찰

*Chlamydomonas reinhardtii*의 정합체에서 분리시킨 endonuclease는 분자량 37 kDa의 monomer이었으며, 반응의 최적 pH가 4.5-6.5 그리고 cofactor로는 금속 2가 양이온을 필요로 하지 않았다는 점이 이제까지 *Chlamydomonas*에서 분리된 다른 nucleases(Sklar *et al.*, 1986; Ogawa and Kuroiwa, 1985a, b, c, 1986; Frost and Small, 1984; Burton *et al.*, 1977)와 다른 것으로 나타났다. 이 순화된 효소는

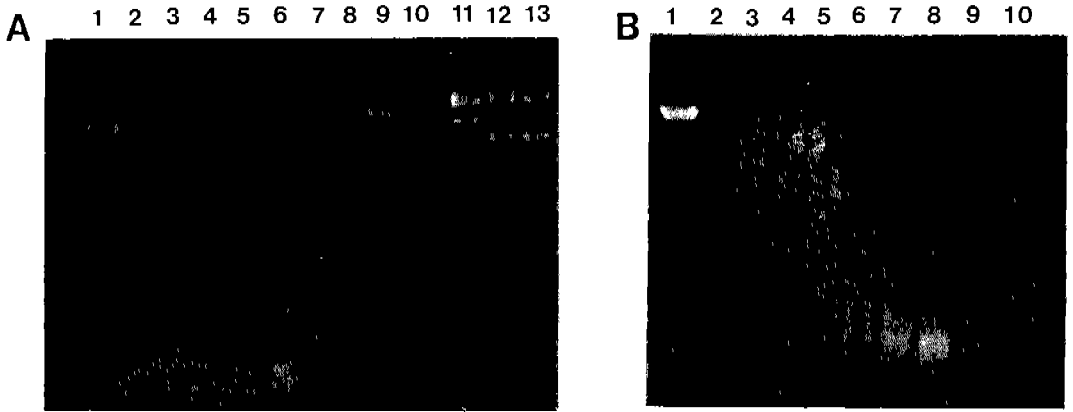


Fig. 7. Effect of temperature and pH on the activity of the purified endonuclease. Reaction was carried under standard reaction conditions except for pH (A) and temperature (B). Symbols: (A) 1-13; control, pH 4.5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, (B) 1-10; control, 5, 10, 15, 20, 30, 37, 45, 55°C.

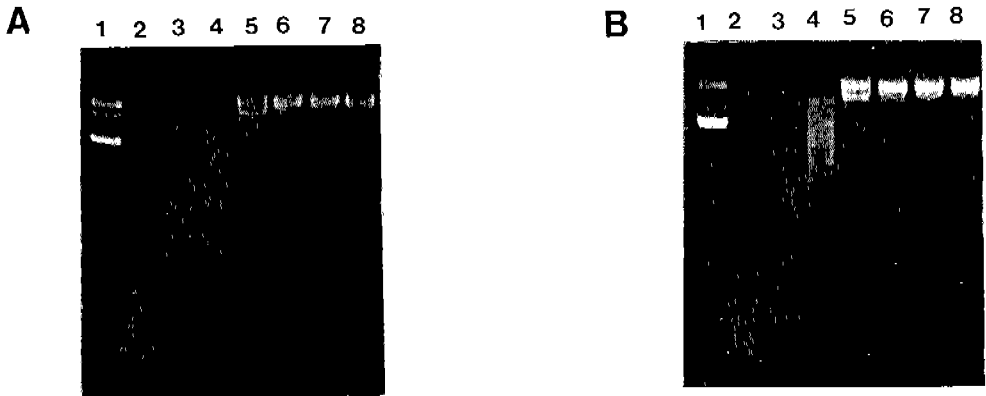


Fig. 8. Effect of salt concentrations on the activity of the purified endonuclease. Reaction was carried under standard reaction conditions except that various amounts of NaCl (A) and KCl (B) were added to the reaction mixture. Symbols: (A) 1-8; control, 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mM NaCl. (B) 1-8; control, 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mM KCl.

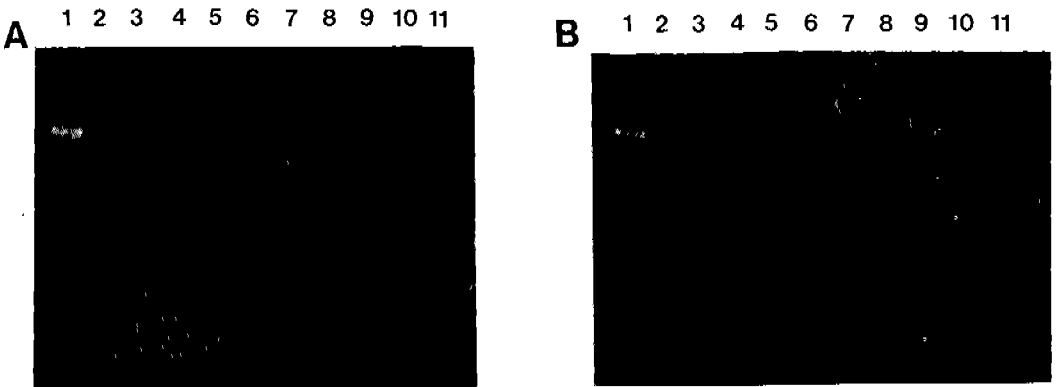


Fig. 9. Effect of metal ions on the activity of the purified endonuclease. (A) 1 mM, (B) 10 mM metal ions. Symbols: 1-11; control, no metal, Ba⁺, Ca⁺⁺, Cd⁺⁺, Co⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ and Zn⁺⁺.

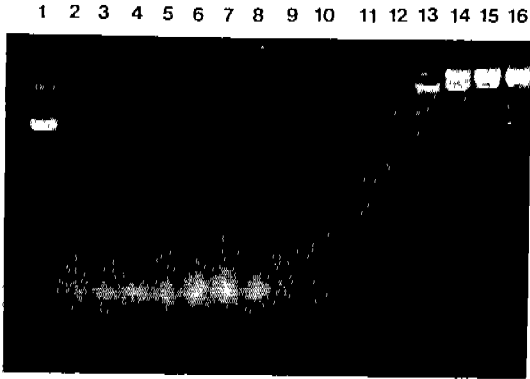


Fig. 10. Effect of putrescine on the digestion of unmethylated pYK322 by purified endonuclease. Symbols 1-16: control, 0, 0.006, 0.012, 0.024, 0.048, 0.097, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mM.

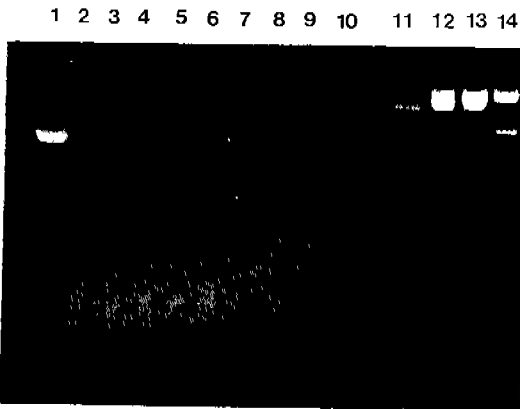


Fig. 11. Effect of spermidine on the digestion of unmethylated pYK322 by purified endonuclease. Symbols 1-14: control, 0, 0.006, 0.012, 0.024, 0.048, 0.097, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 mM spermidine.

nuclease Cl&2(Ogawa and Kuroiwa, 1986)와 같은 endonucleolytic activity를 가지고 있는 것으로 나타났는데, 그것은 unmethylated pYK322 plasmid DNA와 순화된 효소의 전기영동 반응결과에서 관찰할 수 있었다. 순화된 endonuclease에 대한 polyamine의 영향에 있어서는 최근 polyamine이 nuclease의 활성을 촉진 또는 억제한다는 보고(Kuosmanen and Pösö, 1985; Pingoud, 1985; Shishido, 1985; Pingou *et al.*, 1984)에 따라, 본 연구에서는 *Chlamydomonas*의 엽록체 DNA의 모성유전에 관여할 nucleases의 분리와 더불어, polyamine이 모성유전에 관여할 것으로 가정되는 nucleases의 활성에 대한 영향 인자로 작용할 수도 있을 것이라는 가정하에, *Chlamydomonas*의 접합체에서 분리한 endonuclease에 대한 polyamine의 영향을 조사하였다. *In vitro* polyamine의 농도 구간별 처리 조사

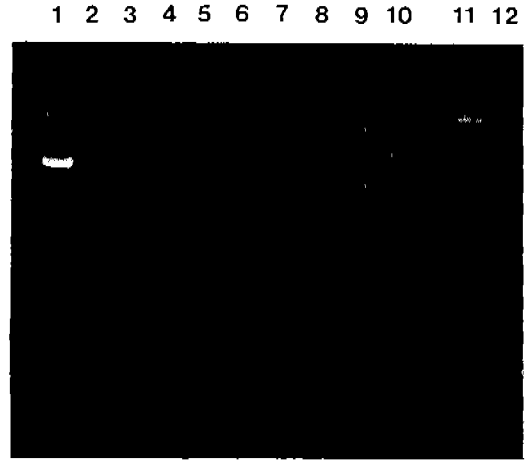


Fig. 12. Effect of spermine on the digestion of unmethylated pYK322 by purified endonuclease. Symbols 1-12: control, 0, 0.006, 0.012, 0.024, 0.048, 0.097, 0.195, 0.391, 0.781, 1.56, 3.125 mM spermine

결과에서 putrescine의 경우에는 25-50 mM, spermidine의 경우는 6.25-12.5 mM 그리고 spermine의 경우는 0.78-1.56 mM 농도 구간에서 그리고 그 이상의 농도에서 효소의 활성이 완전히 억제되었다.

*Chlamydomonas*의 자성과 응성의 각 시기별과 접합체 내의 생리적인 polyamine의 농도에 대하여 보고된 것은 아직 없으나, Kuosmanen and Pösö(1985)가 보고한 일반적인 세포내의 polyamine의 생리적 농도인 0.5-2.0 mM내에서와 비교시, 본 연구의 경우, spermine은 0.78-1.56 mM이라는 거의 동일한 농도 범위내에서, *Chlamydomonas*에서 분리된 endonuclease의 활성을 완전히 억제하였다. 그러나, spermidine과 putrescine의 경우에는 이보다 훨씬 높은 농도에서 endonuclease의 활성을 억제하므로써 생리적인 반응에 있어서의 뚜렷한 의의를 얻기에는 결함이 있다고 사료되나, *Chlamydomonas*의 생리적인 polyamines의 농도가 확실하게 밝혀진 것이 없으므로 뚜렷한 결론을 내리기에는 어렵다. 그리고 효소활성을 완전히 억제시키는 polyamines의 농도가 putrescine, spermidine 그리고 spermine의 경우에 따라 각각 상이한 것은 단순히 polyamines의 영향이 그들의 전하나 크기에 의한 효과라기 보다는 생체내에서의 polyamines의 농도, 크기, 수화정도 그리고 기하학적 구조 등의 분자수준의 효과 등이 복합적으로 작용하여 endonuclease에 대한 억제작용이 상이하게 나타나는 것이 아닌가 생각된다.

위의 결과는 polyamine이 제한효소의 작용을 억제하는 기능이 있다고 보고된 것(Kuosmanen and Pösö, 1985)과 같은 결과라 추측할 수 있는데, polyamines 중 spermine이 putrescine이나 spermidine에 비하여 효소활성의 억제 정도가 보다 큰 이유로는 polyamines 중에서 spermine의

양전하(+4)가 가장 크며 동시에, 크기가 크기 때문에 DNA의 많은 부위를 감쌀 수 있으므로 nuclease의 공격에 영향을 보다 적게 받도록 DNA의 구조를 변화(Basu and Marton, 1987; Behe and Felsenfeld, 1981)시키거나 nuclease가 작용하는 DNA의 부위를 보호함으로써 nuclease의 작용을 억제한다고 생각할 수도 있겠지만, 이러한 polyamine과 DNA와의 상호작용에 의한 endonuclease의 활성 억제에 대한 가능성 이외에 polyamine이 DNA와 같은 기질이 아니라 효소에 직접적인 영향을 줌으로써 효소의 활성을 일시적으로 억제하거나, 크게는 효소 자체의 구조를 변화시킴으로써 효소의 활성을 없애는 경우도 생각할 수가 있겠다. Oat leaf protease와 alfalfa leaf protease의 경우 (Balestreri *et al.*, 1987; Kaur-Sawhney *et al.*, 1982)가 바로 그런 경우인데, 이것들의 경우 polyamines는 저농도의 경우에는 효소의 활성을 일시적으로 억제하였으나, 고농도의 경우에는 효소자체의 구조변화를 유발하여 효소활성을 억제하였다.

따라서 위의 이러한 polyamines의 기질이나 또는 효소 자체에 대한 영향을 근거로 하여 본 연구에서는, *Chlamydomonas*의 접합체에서 분리한 endonuclease의 활성에 대한 polyamines의 억제효과가 어떤 기작에 의한 것인지를 규명하는 것이 분리된 endonuclease와 DNA methylation과의 상호 연관성에 대한 연구와 더불어 다음 연구과제라고 본다.

적 요

*Chlamydomonas reinhardtii*의 접합체에서 약 4500 units 정도의 non-specific endonuclease를 순화하였다. Sephadex G-150 gel filtration과 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 전기영동에 의한 측정 결과, 이 효소는 분자량 약 37 kDa의 monomer임이 밝혀졌다. 이 효소의 반응 최적온도는 37°C였고 염에 대한 요구성은 없었으며, pH 4.5-6.5 사이에서 높은 활성을 나타내었다. 또한 cofactor로써는 금속 2가 양이온을 요구하지 않았다.

Endonuclease의 반응용액에 polyamines의 농도 구간별 처리시에는 전반적으로 putrescine, spermidine, spermine 순으로 순화된 endonuclease의 활성에 대한 억제 정도가 증가하였는데, putrescine의 경우에는 25-50 mM, spermidine의 경우에는 6.25-12.5 mM 그리고 spermine의 경우에는 0.78-1.56 mM의 농도구간에서 효소의 활성이 완전히 억제되었다. 따라서 *Chlamydomonas*의 접합체에서 추출한 endonuclease에 대한 polyamines의 영향은 대체로 전하가 크고 길이가 긴 polyamine일수록 효소 활성의 억제 정도가 크게 나타나는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

Andrew, P. 1964. Estimation of the molecular weight of pro-

teins by sephadex gel filtration. *Biochemistry* 91: 222-233.

Balestreri, E., P. Cioni, A. Romagnoli, S. Bernini, A. Fissi and R. Felicioli. 1987. Mechanism of polyamine inhibition of a leaf protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 460-463.

Basu, H.S. and L.J. Marton. 1987. The interaction of spermine and pentamines with DNA. *Biochem. J.* 244: 243-246.

Behe, M. and G. Felsenfeld. 1981. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1619-1623.

Bloodgood, R.A. and E.N. Levin. 1983. Transient increase in calcium efflux accompanies fertilization in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 97: 397-404.

Burton, W.C., R.J. Roberts, P.A. Myers and R. Sager. 1977. A site-specific single-strand endonuclease from the eukaryote *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2689-2691.

Buton, W.G., C.T. Grabow and R. Sager. 1979. Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1390-1394.

Frost, B.F. and G.D. Small. 1984. Partial purification and characterization of the major AP endonuclease from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 782: 170-176.

Geider, K. and A. Kornberg. 1974. Conversion of the M13 viral single strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *J. Biol. Chem.* 249: 3999-4005.

Gellert, M., K. Mizuuchi, M.H. O'Dea and H.A. Nash. 1976. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3872-3876.

Jänne, J., H. Pösö and A. Raina. 1978. Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 473: 241-293.

Kaur-Sawhney, R., L. Shih, T. Cegielska and A.W. Galston. 1982. Inhibition of protease activity by polyamines. *FEBS Lett.* 145: 345-349.

Krasnow, M.A. and N.R. Cozzarelli. 1982. Catenation of DNA rings by topoisomerases. Mechanism of control by spermidine. *J. Biol. Chem.* 257: 2687-2693.

Kuosmanen, M. and H. Pösö. 1985. Inhibition of the activity of restriction endonucleases by spermidine and spermine. *FEBS Lett.* 179: 17-20.

Kuroiwa, T., S. Kawano and C. Sato. 1983a. Mechanisms of maternal inheritance. I. Protein synthesis involved in preferential destruction of chloroplast DNA of male origin. *Proc. Jap. Acad.* 59: 177-181.

Kuroiwa, T., S. Kawano and C. Sato. 1983b. Mechanisms of maternal inheritance. II. RNA synthesis involved in

- preferential destruction of chloroplast DNA of male origin. *Proc. Jap. Acad.* **59**: 182-185.
- Kuroiwa, T., S. Kawano, S. Nishibayashi and C. Sato. 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* **298**: 481-483.
- Lillehaug, J.R. and K. Kleppe. 1975. Effect of salts and polyamines of T₄ polynucleotide kinase. *Biochemistry* **14**: 1225-1229.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. pp. 86-96.
- Nakamura, S., C. Sato and T. Kuroiwa. 1988. Polypeptides related to preferential digestion of male chloroplast nucleoids in *Chlamydomonas*. *Plant Sci.* **56**: 129-136.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985a. Nuclease C polymorphism of calcium dependent nucleases in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 481-491.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985b. Destruction of chloroplast nuclei of the male gamete by calcium and nuclease C in a cell model of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 493-503.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1985c. Purification of major isozymes of nuclease C and production of active fragments by trypsin. *Plant Cell Physiol.* **26**: 1478-1484.
- Ogawa, K. and T. Kuroiwa. 1986. Base-specific endo-exonucleolytic activity of *Chlamydomonas* nuclease C1&2. *Plant Cell Physiol.* **27**: 701-710.
- Pingoud, A. 1985. Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* **147**: 105-109.
- Pingoud, A., C. Urbanke, J. Alves, H.J. Ehbrecht, M. Zabeau and C. Gualerzi. 1984. Effect of polyamines and basic proteins on cleavage of DNA by restriction endonucleases. *Biochemistry* **23**: 5697-5703.
- Pirrota, V. and T.A. Bickle. 1980. General purification schemes for endonuclease. *Methods Enzymol.* **65**: 89-95.
- Rae, A.J., R.K. Kleppe and K.Kleppe. 1975. Kinetics and effect of salts and polyamines on T₄ polynucleotide ligase. *Eur. J. Biochem.* **60**: 437-443.
- Sager, R. 1954. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**: 356-363.
- Sager, R. and C. Lane. 1972. Molecular basis of maternal inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2410-2413.
- Sano, H. and R. Sager. 1980. Deoxyribonucleic acid methyltransferase from the eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **105**: 471-480.
- Schekman, R., W. Wicker, O. Westergaard, D. Brutlag, K. Geider, L.L. Bertsch and A. Kornberg. 1972. Initiation of DNA synthesis: Synthesis of $\phi\lambda$ /174 replicative form requires RNA synthesis resistant to rifampicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2691-2695.
- Shishido, K. 1985. Effect of spermine on cleavage of plasmid DNA by nucleases S₁ and Bal 31. *Biochim. Biophys. Acta* **826**: 147-150.
- Sklar, R., D. Altman and R. Sager. 1986. An endonuclease from *Chlamydomonas reinhardtii* that cleaves the sequence TATA. *J. Biol. Chem.* **261**: 6806-6810.
- Snell, W.J. 1982. Study of the release of cell wall degrading enzymes during adhesion of *Chlamydomonas* gametes. *Exp. Cell Res.* **138**: 109-119.
- Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.

(1990. 11. 2. 接受)