

## 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 현탁배양 세포에서 DNA 합성에 미치는 Polyamine의 효과

南 環 姬 · 朴 基 榮\* · 李 舜 熙

(연세대학교 이과대학 생물학과, \*순천대학교 생물학과)

## Effects of Polyamines on DNA Synthesis in *Nicotiana tabacum* L. Suspension Cultured Cells

Nam, Kyoung-Hee, Ky Young Park\* and Sun-Hi Lee

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and

\*Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon)

### ABSTRACT

Effects of polyamines on DNA synthesis were studied in synchronized culture of *Nicotiana tabacum* L. When DFMO and DFMA, inhibitors of ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase, respectively were initially applied to the cells, the polyamine contents were rapidly dropped and [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine incorporation into DNA was markedly reduced during the early stage of culture period. Inhibition of DNA synthesis, however, was partially reversed when these inhibitors were applied simultaneously with putrescine. In addition, exogenous administration of putrescine also increased the DNA synthesis during the all over the culture period. *In vitro* activity of DNA polymerase from *Nicotiana tabacum* L. was promoted by increasing concentrations of polyamines in the reaction mixture. Maximal activity was shown at 5 mM putrescine, 0.5 mM spermidine and spermine, respectively. Lack of Mg<sup>2+</sup> ion in the reaction buffer resulted in an inhibition of the enzyme activity by about 30%. The inhibition could not be completely reversed by application of polyamines at optimal concentraions. These results suggest that polyamines promote the DNA synthesis *in vivo* and *in vitro* by stabilizing the DNA-helix upon binding to negatively charged groups on DNA or increasing the activity of DNA polymerase in *Nicotiana tabacum* L.

### 서 론

생체내에 존재하는 polyamine은 다가 양이온의 특성을 나타냄으로써 생체내에서 음이온을 띠고 있는 물질과 결합할 수 있다. 예를 들어 spermine의 경우 DNA의 major groov에 결합하여 구조적인 변화를 유발시키거나(Basu and Marton, 1987; Sanjeev *et al.*, 1989), *in vitro*에서 B-form DNA에서 Z-form DNA로의 전환을 유발하며 DNA aggregation에도 영향을 미친다(Basu *et al.*, 1989). 이렇게 DNA와 결합된 경우 DNA 구조를 안정화시켜 DNA의 변성 온도를 높인다(Frink and Pettijohn, 1975; Hung *et al.*, 1982). 이밖에도 yeast tRNA<sup>Phe</sup>의 anticodon 부근에 spermine이 내부에 존재하여 viron의 형성이나 packaging시 vi-

ral RNA에 결합된 형태로 분리된다는 보고(Cohen and Greenburg, 1981)와, *in vitro*에서 polyamine이 DNA-actinomycin D 복합체를 안정화시킨다는 보고(D'Orazi *et al.*, 1979) 등으로 볼 때 polyamine이 핵산의 구조적 측면에 많은 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

이러한 사실이 *in vivo*에서 polyamine이 세포의 성장과 직접적으로 어떠한 연관성이 있는지의 여부는 확실하지 않으나, putrescine이 포유류의 DNA 합성에 필수적인 요소이며(Sunkara *et al.*, 1977), concanavalin A로 활성화된 lymphocytes의 DNA 합성에도 내생 spermidine이나 spermine의 증가가 선행되어야 한다는 점과(Fillingame *et al.*, 1975), polyamine 합성의 key enzyme인 ornithine decarboxylase(ODC)의 억제제인  $\alpha$ -difluoromethyl ornithine

(DFMO) 처리시 세포는 cell cycle의 G<sub>1</sub> phase에서 정지된다(Gallo *et al.*, 1986)는 사실 등은 polyamine이 세포의 성장에 중요하게 관여함을 나타낸다.

한편 식물체에서도 성장 속도가 빠른 조직일수록 polyamine의 수준이 높고, polyamine 생합성의 key enzyme인 ODC나 arginine decarboxylase(ADC)의 합성 및 활성이 높아진다는 보고가 많이 있다(Heimer *et al.*, 1979; Cohen *et al.*, 1982). 그리고 고등 식물에서는 비교적 연구가 미흡한 분야이기는 하나 starvation method 나 생화학적인 DNA 합성억제제를 이용하여 동시성 배양을 유도한 후 시행한 cell cycle의 연구에서, 세포의 생장이 활발히 일어나는 동안 putrescine과 spermidine의 수준은 DNA 합성이 일어나는 S phase 직전이나 진행중에 최대치를 나타내고, 세포 분열시기인 M-phase 동안에는 그 양이 감소한다고 알려져 있다(Fracassini *et al.*, 1987). 그러나 polyamine으로 인하여 다양한 생리적 작용들이 나타남에도 불구하고 그 정확한 기능이나 근본적인 작용 기작은 아직 규명되어 있지 않다.

본 연구에서는 고등 식물인 담배(*Nicotiana tabacum* L.)의 현탁 배양세포를 재료로 하여 세포 분열이 가장 활발할 때 polyamine이 DNA 합성에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다. 이를 위하여 첫째, 세포를 동시성 배양으로 유도하여 비교적 동질성이 높은 상태로 cell cycle을 맞춘 다음, 세포가 S phase를 진행하는 동안 polyamine을 외부에서 처리하거나, polyamine 생합성억제제를 처리하여 시간에 따른 polyamine 생합성량을 조사하였고, DNA 합성률을 *in vivo*에서 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine이 DNA로 incorporation되는 양상을 통하여 알아보았다. 둘째, 더 나아가 DNA 합성의 key enzyme이라 할 수 있는 DNA polymerase를 부분 분리하여 *in vitro*에서 polyamine이 DNA 합성에 관여할 수 있는지의 여부를 조사하여 보았다.

## 재료 및 방법

**담배의 동시성 현탁 배양.** 담배(*Nicotiana tabacum* L.)의 현탁 세포를 B5 액체 배지에서 120 rpm의 속도로 진탕 배양하면서 14일 간격으로 계대 배양하였다( $4 \times 10^6$  cells/mL 배지).

세포의 동시성 유도는 Nishinar과 Syöno(1986)의 방법과 Pfosser(1989)의 방법을 수정하여 사용하였다. 계대 배양 후 4일된 세포에 membrane filtration을 통하여 DNA 합성억제제인 hydroxy urea(100 µg/mL 배지)를 24시간 처리하였고 다시 B5 기본 배지로 옮겨 24시간 배양한 후 mitotic index를 측정할 다음 각 시간별로 수확하여 재료로 사용하였다.

이 시기를 기준으로 하여 50 mL Erlenmeyer flask에 20 mL의 B5 배지를 넣고 putrescine 0.1 mM, 0.01 mM, poly-

amine 생합성억제물질인 DFMO 1 mM, α-difluoromethylarginine (DFMA) 1 mM을 필요에 따라 각각 첨가하여 적절한 시간 간격으로 세포를 수확하여 polyamine의 외부 처리나 혹은 결핍에 의한 영향을 조사하였다.

**Polyamine의 추출 및 정량.** Goren 등(1982)의 방법을 수정하여 사용하였다. 세포를 여과지에 수거하여 증류수로 세척하고 생체량 0.1 g을 600 µL의 5% perchloric acid로 균질화시킨 후 4°C에서 27,000 g로 20분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 상정액 200 µL, dansylchloride 400 µL(5 mg/mL acetone), 포화된 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 µL를 혼합하여 암처리된 상태로 상온에서 16시간 반응시킨 후 100 µL의 proline(100 mg/mL)을 넣어 30분간 반응시켰다. Dansyl 유도체는 500 µL의 benzene으로 추출하여 그 중 100 µL를 silica gel thin layer plate에 점적하였다. Chloroform : triethylamine(100 : 9, v/v)의 전개 용매로 전개시키고, 자외선 아래에서 표준 시료와 비교하여 끊어낸 다음 ethylacetate 5 mL로 용출시켰다. 이것을 excitation 350 nm, emission 500 nm 상태에서 형광도를 측정하였다(Perkin-Elmer LS-5 luminescence spectrometer).

**DNA 합성률의 측정.** Sala(1980, 1983)의 방법을 수정하여 시행하였다. 시간별로 배양중인 세포 1 mL을 채취하여 2 µCi의 [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine(25 Ci/mmole, Amersham)을 넣어 26°C에서 1시간 반응시키고 1 mL의 10% trichloroacetic acid로 반응을 정지시켰다. Hand-glass homogenizer로 세포를 균질화시킨 후 GF/C filter paper에 수거하여 5% trichloroacetic acid 용액으로 7회, absolute alcohol과 ether로 각각 2회씩 세척한 후 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

**DNA polymerase의 부분 분리.** Amileni 등(1979) 및 Stevens과 Bryant(1978)의 방법을 수정하여 시행하였다. 세포 분열이 활발한 4일된 세포를 nylon mesh를 이용해 수거한 후 1 mM Mg-acetate과 20 mM NH<sub>4</sub>Cl이 포함된 10 mM Tris-HCl(pH 7.9) 완충액으로 3회 세척하였다. 여기에 재현탁 용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.5 mM DTT, 0.5% triton X-100)을 첨가하여 세포를 균질화시킨 후 최종 농도가 0.25 M이 되도록 potassium phosphate 완충액(pH 7.5)을 가하여 다시 균질화시키고 20,000 g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 모았다. 여기에 최종 농도가 20% 되도록 glycerol을 가한 후 20% glycerol과 0.5 mM DTT로 이루어진 부석용액에서 천천히 교반시킨 다음 추출액을 완충액 I(20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 0.5 mM DTT, 20% glycerol)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(1.5×7 cm)에 적용시켜 완충액 I을 흘려주고 potassium phosphate 완충액 농도구배(0.02 M~0.4 M)로 용출시켰다. 효소 활성이 있는 분획 구간을 농축시켜 20% glycerol과 0.5 mM DTT 용액으로 1 : 1 희석하여 이것을 다시

완충액 II (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, 20% glycerol, 0.5 mM DTT)로 평형화시킨 phosphocellulose column(1×14 cm)에 적용시켜 potassium phosphate 완충액 농도구배(0.1 M~0.5 M)에서 용출시켰다. 여시서 얻은 활성 구간을 YM-30 ultramembrane filter를 이용하여 농축한 후 최종 효소원으로 사용하였다.

효소 활성 측정은 20 mM potassium phosphate(pH 7.2), 0.5 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 각각 400 μM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, activated calf thymus DNA(60 μg/mL), 125 μM의 [<sup>3</sup>H]dTTP(40 Ci/mole, Amersham), enzyme fraction 50 μL로 이루어진 반응 용액을 37°C에서 90분간 반응시킨 후 2 mM의 Na-pyrophosphate가 포함된 5% trichloroacetic acid로 반응을 정지시켰다. 이것을 GF/C filter paper에 수거하여 5% trichloroacetic acid로 충분히 씻어낸 후 방사능을 측정하였다.

DNA polymerase의 활성단위는 37°C에서 60분동안 1 pmole의 nucleotide를 DNA에 incorporation시킬 수 있는 활성을 1 unit로 하였다.

DNA polymerase 활성에 미치는 polyamine의 영향. DNA polymerase의 활성을 측정하기 위한 반응 용액에 10 μM에서 20 mM까지 putrescine, spermidine, 또는 spermine을 각각 처리하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. Mg<sup>2+</sup> ion의 대치 효과를 보기 위해서는 반응 용액에 Mg<sup>2+</sup> ion을 첨가하지 않고 polyamine만을 넣어 위와 동일하게 실험하였다.

단백질 정량. 효소 단백질은 coomassie brilliant blue G-250 0.01%(w/v)로 염색하여 595 nm에서 spectrophotometer(Hitachi, U-2000)로 흡광도를 측정하였으며, 이때

표준 단백질은 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다 (Bradford, 1976).

### 결과 및 고찰

Polyamine의 생합성억제제와 외부에서 처리한 putrescine과 spermidine이 DNA 합성에 미치는 영향. 식물 세포에서 polyamine의 생합성은 ornithine이 ODC에 의하여 탈탄산되어 putrescine이 생성되는 ODC pathway와 ADC에 의하여 arginine이 agmatine으로 전환된 후 putrescine이 생성되는 ADC pathway 등 2가지 경로로 이루어지는데, DFMO와 DFMA는 각 pathway의 key enzyme인 ODC와 ADC의 활성을 선택적이며 비가역적으로 억제하는 것으로 알려져 있다(Smith, 1985). 일단 합성된 putrescine은 aminopropyl transferase에 의하여 spermidine으로 전환되고, 다시 한 분자의 aminopropyl기가 더해져서 spermine으로 된다. 이 과정에서 aminopropyl기의 공여체는 decarboxylated *s*-adenosylmethionine(decarboxylated SAM)이다. 따라서 SAM을 탈탄산시키는 SAMDC 또한 polyamine 생합성의 key enzyme이며, methylglyoxal-bis(guanyldrazone) (MGBG)은 SAMDC의 활성을 가역적으로 억제하는 물질이다(Lin, 1985).

동시성 배양한 담배 세포에 DFMO를 처리하여 계속 배양하면서 polyamine 수준의 변화를 관찰한 결과, putrescine의 수준은 배양 초기부터 대조구에 비하여 급격히 감소하여 계속 낮은 수준을 유지하나 배양 후기인 20시간 이후에는 급격하게 증가하였다(Fig. 1). 절대량의 면에서 볼 때 이러한 증가는 spermidine으로의 전환이 감소하여 put-

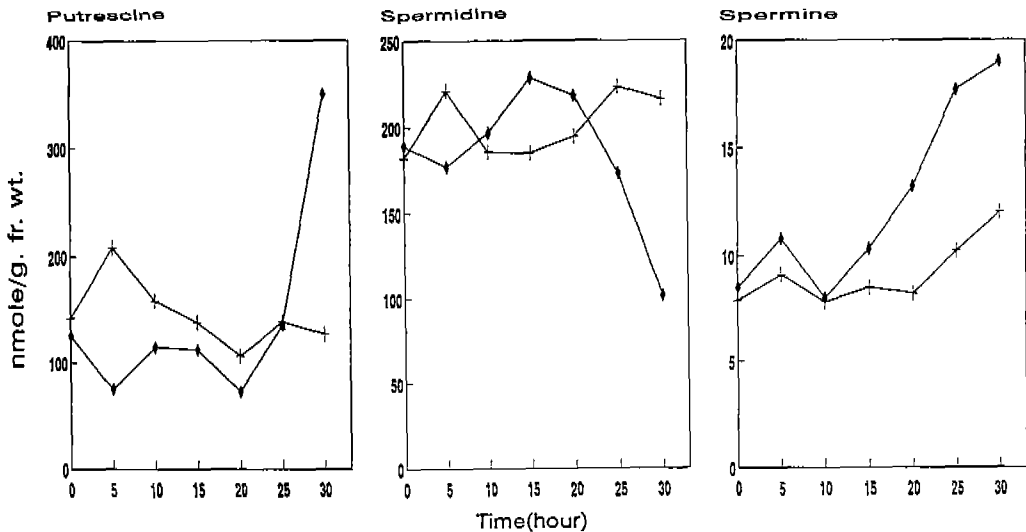


Fig. 1. Changes in the levels of polyamines in synchronized tobacco cells treated with 1 mM DFMO. + + +, control; ◆-◆, treated cells.

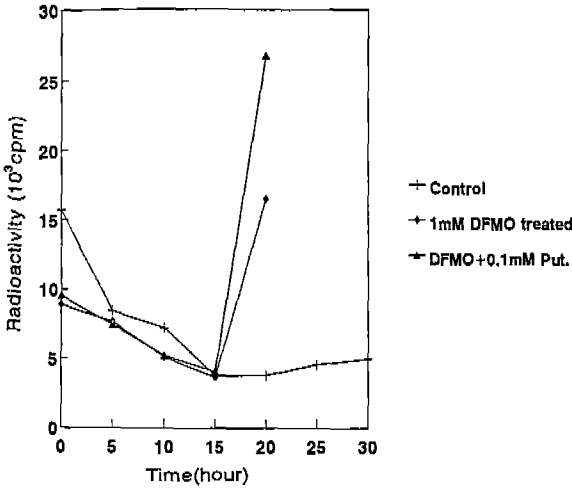


Fig. 2. The incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine into DNA after treatment of 1mM DFMO alone or 1mM DFMO with 0.1 mM putrescine in synchronized tobacco cells.

rescine이 축적된 것이라고는 생각되지 않는다. Polyamine 합성에 ODC pathway만을 사용하는 동물 세포에서는 많은 경우 DFMO의 처리로 인하여 polyamine이 부족해지면 ODC gene의 발현이 증가한다는 보고가 있으며(Heby and Persson, 1990), ADC pathway와 ODC pathway를 모두 이용하는 식물 세포의 경우 당근 세포에 DFMO를 처리할

때 배양 전기간에 거쳐 ADC 활성이 대조구에 비하여 높아지고, 특히 그 증가량은 24시간 이후부터 48시간 사이에 최고인 것으로 나타났다(Robie and Minocha, 1989). 이는 식물 세포에서는 DFMO 처리로 인하여 ornithine이 putrescine으로 전환되지 못하고 축적된다면 urea cycle에 의하여 ornithine이 arginine으로 전환된 후 ADC pathway를 통하여 putrescine을 생성한다고 볼 수 있다. 다른 한편으로는 DFMO 처리의 결과로 나타난 putrescine의 결핍이 오히려 ADC의 활성을 증가시키는 결과를 유도했으리라 생각할 수 있다. DFMO가 처리된 본 실험 재료에서는 배양 10시간 정도까지는 putrescine과 spermidine의 양이 크게 감소했는데, 이 기간 동안의 DNA 합성률도 DFMO에 의하여 10~40% 정도 억제되었다(Fig. 2). 그리고 배양 후기에 putrescine의 합성이 대조구에 비하여 월등히 빨라지면서 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine의 incorporation도 급격히 증가하였던 것으로 볼 때, putrescine 수준의 변화와 DNA 합성에는 일정한 상관 관계가 있으리라 생각된다.

그런데 DFMA를 처리한 경우 putrescine 수준은 DFMO를 처리한 경우와는 달리 배양 전 기간에 걸쳐 상당히 억제되었고 회복 현상도 보이지 않았다(Fig. 3). 이는 식물체에서 putrescine의 합성은 주로 ADC 경로를 이용하기 때문인 것으로 생각된다(Kevin and Phillips, 1988). DFMO와 DFMA를 처리한 두 경우 모두 spermine의 수준이 대조구에 비하여 높아졌는데 이는 세포내 aminopropyl기를 저장하기 위하여 spermidine으로부터 spermine으로의 전환이 쉽게 일어나기 때문일 것이다(Kevin and Phillips,

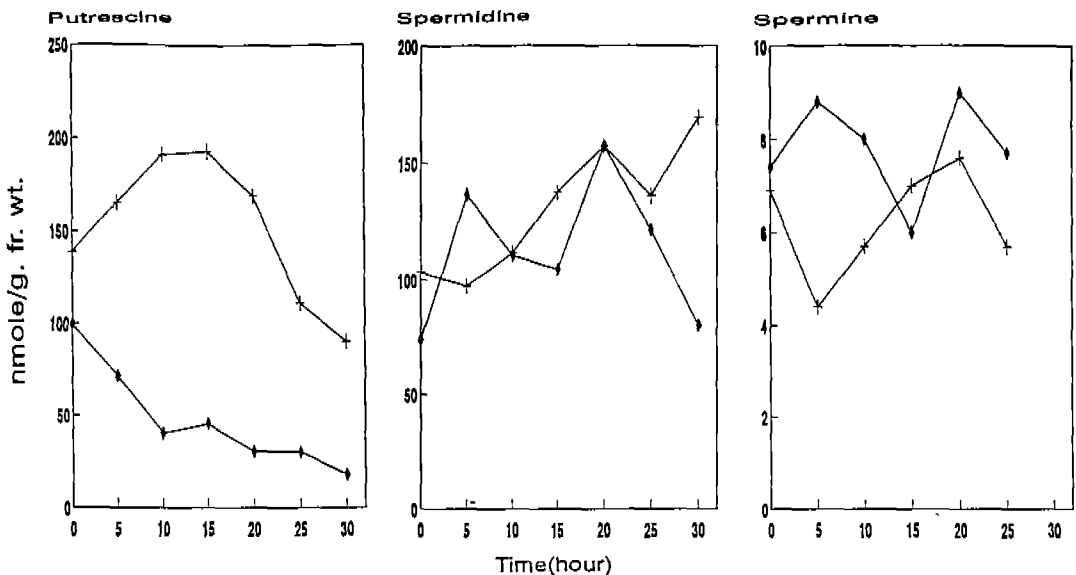


Fig. 3. Changes in the levels of polyamines in synchronized tobacco cells treated with 1mM DFMA. ○—○, control; ◆—◆, treated cells.

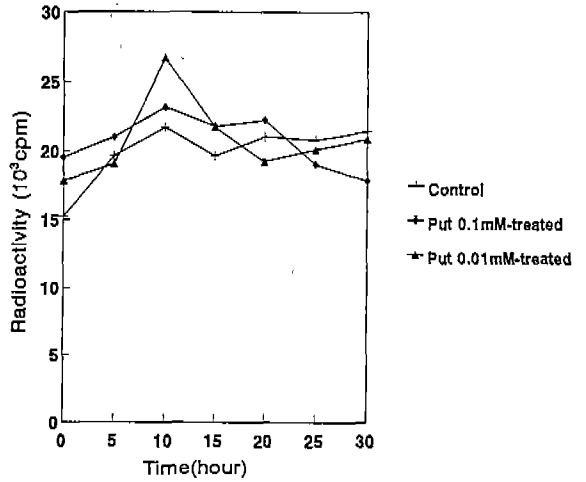
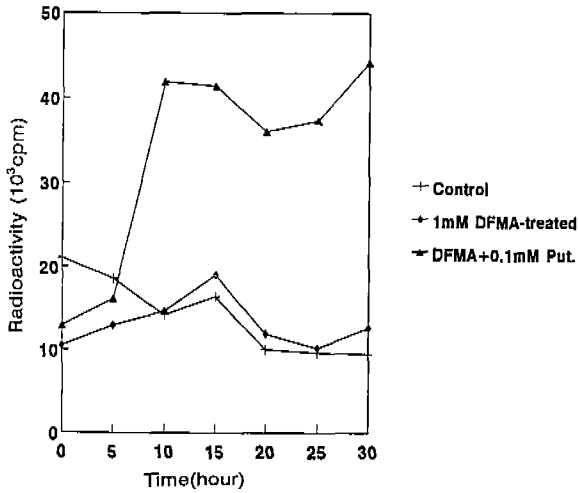


Fig. 4. The incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine into DNA after treatment of 1 mM DFMA alone or 1mM DFMA with 0.1 mM putrescine in synchronized tobacco cells.

Fig. 5. The incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine into DNA after treatment of 0.1 mM or 0.01 mM putrescine in synchronized tobacco cells.

1988). 그런데 DFMA를 처리한 세포의 경우 배양 초기에는 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine의 incorporation 양이 대조구에 비하여 크게 감소했으나 10여 시간 이후에는 putrescine의 합성이 계속 억제되었음에도 불구하고 대조구와 비슷한 수준을 나타내었다(Fig. 4).

한편 세포내 polyamine을 처리할 경우 DNA 합성 양상이 대조구와 유사하게 조절되는지를 알아보기 위하여 0.1 mM의 putrescine을 DFMO나 DFMA와 동시에 처리하여 세포를 배양하였다. DFMO와 putrescine을 동시에 처리하였을 때 incorporation되는 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine의 양이나 속도는 DFMO만 단독으로 처리하였을 때에 비하여 별 차이가 없으나, DNA 합성이 회복되기 시작하는 시간이 약 5시간 정도 빠르게 나타났다(Fig. 2). 반면에 DFMA와 putrescine을 함께 처리한 경우는 첨가 직후부터 5시간 동안 DNA 합성이 대조구보다 크게 증가하였다(Fig. 4). 이는 ODC와 ADC의 세포내 분포 위치가 각각 핵과 세포질이라는 보고로 미루어 볼 때(Smith, 1985), 외부에서 처리한 putrescine이 배양 초기에 핵내에서 고갈되는 putrescine pool을 회복시키기에는 일정 정도의 지연 기간이 필요하고, 세포질에서 고갈되는 putrescine pool의 경우 외부에서 처리한 putrescine에 의하여 세포내 수준보다 높아지면 DNA 합성에 보다 부가적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 putrescine 생합성억제제를 처리한 경우 putrescine 양의 감소와 그에 수반된 배양 초기의 DNA 합성 감소를 볼 수 있었다. 그렇다면 polyamine이

정상적인 세포내 수준보다 높게 유지될 때, 즉 외부에서 polyamine을 처리한 경우 DNA 합성이 어떤 양상을 보이는지 알아보았다. 0.01 mM과 0.1 mM의 putrescine을 각각 처리한 경우 모두 대조구와 양상은 거의 같지만 DNA로 incorporation되는 [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine의 수준은 10~20% 정도 높게 나타났다(Fig. 5). 이제까지 식물체에서 polyamine이 cell cycle에 미치는 영향에 대한 연구는 자연 상태에서 세포의 동시성이 이루어지는 재료를 대상으로 하여 보고되었다. 예를 들어 11월경에 G<sub>1</sub> phase에서 세포의 대사가 정지되어 휴면상태로 있다가 2,4-D를 첨가할 때 동시성 cell cycle이 유도되는 *Helianthus tuberosus*의 경우 polyamine 수준이 점차 증가하여 S phase에 최대치에 이르며, 또한 이때 ODC나 ADC의 활성도 최대인 것으로 보고되었다(Torrigiani *et al.*, 1987). *Chlorella*의 cell cycle에서도 polyamine 수준과 ODC의 활성은 S phase 직전에 최대를 나타내었다(Cohen *et al.*, 1984). 그리고 최근 double phosphate block method를 사용하여 동시성 배양을 유도한 *Catharanthus roseus*의 현탁 배양 세포에서 DFMA를 처리할 경우 G<sub>1</sub> phase에서 S phase로 진행하지 못하는 세포의 수가 가장 많고, spermidine synthase의 억제제인 dicyclohexylamine(DCHA)는 비교적 고농도(10 mM)로 처리되어도 cell cycle의 진행에 영향을 미치지 못했다(Maki *et al.*, 1991). 이는 putrescine이 cell cycle의 진행에 필수적임을 나타내는 것이라 할 수 있다. 그런데 고등식물 세포의 경우 비교적 동질성이 높은 상태로 배양이 가능한 액체 현탁 배양에 있어서도 동시성 배양을 유도하는 때 최마다 다소 차이가 난다. DMA 합성억제제인 hydroxy urea를

Table 1. Partial purification of DNA polymerase from *Nicotiana tabacum* L.

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Fold	Recovery (%)
Crude extract	29.2	2385	81.67	1	100
DEAE-cellulose	0.89	337	378.65	4.64	14.1
Phosphocellulose	0.33	1659	5027.3	61.56	69.5

사용하면 23% 정도의 동시성을 얻을 수 있고 저온 처리와 병행하면 40% 정도까지 동시성을 높일 수 있으나(Nishinari and Syōno, 1986), 본 실험의 경우 저온 처리는 세포에 stress로 작용하여 stress enzyme이라 할 수 있는 ADC의 활성이 급격히 높아지기 때문에 적절하지 않았다. 본 실험의 경우 모든 세포가 동시에 S phase로 진행하지 못했기 때문에 DNA 합성량에 미치는 polyamine의 효과는 다소 반감되었다고 생각된다. 그러나 생합성억제제 처리나 외부에서의 처리로 polyamine 수준의 변화를 유발시켰는데 대조구에 비하여 처리구에서 배양초기에 DNA 합성량의 감소는 뚜렷하게 나타났다.

담배세포에서 추출한 DNA polymerase 활성에 미치는 polyamine의 영향. DNA 합성이 polyamine에 의하여 영향을 받느냐는 이상의 결과들은 polyamine이 DNA가 합성되는 단계에서인가 영향을 미친다는 것을 나타내므로 담배 세포에서 DNA polymerase를 분리하여 효소의 활성에 대해 polyamine이 영향을 미치는가를 *in vitro*에서 조사하였다.

가장 활발하게 성장중인 4일째되는 세포에서 DEAE-cellulose column chromatography와 phosphocellulose column chromatography를 수행하여 61.56배로 DNA polymerase를 부분 순화하였다(Table 1). 먼저 효소 활성의 반응성을 조사하기 위하여 *Micrococcus luteus*로부터 추출한 DNA polymerase를 대상으로 20 mM potassium phosphate(pH 7.2)에 polyamine의 농도를 증가시키면서 활성을 측정하였다(Fig. 6). Polyamine이 반응 용액에 첨가되지 않았을 때의 효소 활성을 100% 하였을 때, putrescine과 spermidine의 경우 저농도에서부터 점차로 활성이 증가되다가 1 mM에서는 각각 200%, 172%로 촉진되었으나 5 mM 이상의 농도에서는 오히려 억제되었다. 그런데 spermine의 경우는 이보다 훨씬 낮은 농도인 0.5 mM에서 164%로 높은 촉진효과를 보인 후 5 mM까지는 putrescine이나 spermidine의 촉진효과보다 더 높은 수준을 유지하다가 그 이후 급격히 효소 활성이 억제되었다. 담배 세포에서 부분 분리한 DNA polymerase에 대해서도 농도별 polyamine의 영향을 조사한 결과, 저농도의 polyamine이 효소 활성을 증가시키는 양상은 *Micrococcus luteus*의 DNA polymerase에서의 경우와 유사하였으나, 최대 활성 촉진이 훨씬

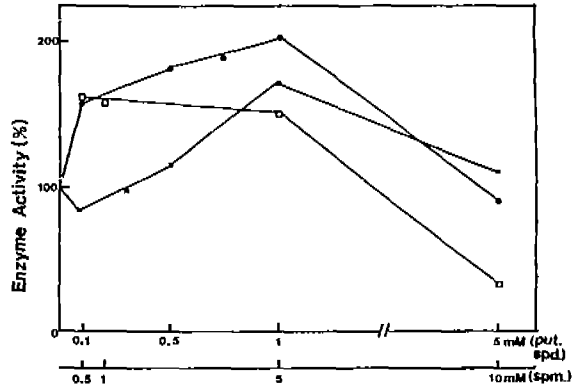


Fig. 6. Effect of polyamines on the activity of DNA polymerase from *Micrococcus luteus*. Activity (100%) of the control was 16277 cpm. ●-●, putrescine; ■-■, spermidine; □-□, spermine.

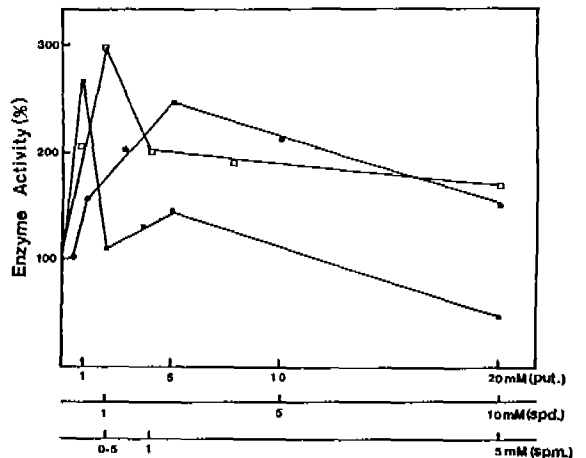


Fig. 7. Effects of polyamines on the activity of DNA polymerase from *Nicotiana tabacum* L. Activity (100%) of the control was 594 cpm. ●-●, putrescine; ■-■, spermidine; □-□, spermine.

낮은 농도에서 나타났다(Fig. 7). 즉 putrescine은 5 mM에서 244% 정도 효소 활성을 촉진시킨 후 그 정도가 점차 감소하기는 하나 20 mM을 처리할 때까지도 대조구에 비해

Table 2. Effects of polyamines on MgCl<sub>2</sub> requirement for DNA polymerase activity from *Nicotiana tabacum* L.

Treatment	Enzyme activity (cpm)	Percent (%)
Control	613	100
MgCl <sub>2</sub>	437	71.3
MgCl <sub>2</sub> + Put(5 mM)	521	85.0
MgCl <sub>2</sub> + Spd(0.5 mM)	410.8	67.0
MgCl <sub>2</sub> + Spm(0.5 mM)	744	121.3

150% 정도 높은 활성을 유지시켰다. Spermidine과 spermine은 각각 0.5 mM 처리시 267%, 299%의 비율로 효소 활성을 최대로 촉진시켰으나 그 이상의 농도에서는 점차 효소 활성이 감소하였다. 지금까지 보고된 바로는 calf thymus에서 추출한 DNA polymerase- $\alpha$ 는 0.5~1.0 mM의 spermidine이나 2~10  $\mu$ M의 spermine이 반응 용액이 포함될 때 효소 활성이 134% 정도 증가되며(Yoshida *et al.*, 1976), loach(*Misgurnus fossilis*)에서 분리한 DNA polymerase의 경우는 10 mM의 putrescine, 3 mM의 spermidine, 1 mM의 spermine의 농도에서 활성이 최대로 증가되었다(Mikhailov and Androsova, 1984). 한편, 사람의 혈청에서 분리한 DNA polymerase는 30 mM의 putrescine, 3 mM의 spermidine, 0.2 mM의 spermine 농도에서 효소 활성이 147~225% 증가되었다(Shimamura *et al.*, 1990).

이상의 결과들로 볼 때 polyamine은 DNA 상에 음이온을 띠고 있는 phosphate residue와 작용하여(Wilson and Bloomfield, 1979) DNA 구조를 안정화시키거나, 주형 DNA에 대한 DNA polymerase의 turn over time을 변화시킴으로써(Mikhailov and Androsova, 1984) 효소 활성을 촉진하는 결과를 나타내었다고 생각할 수 있다. 물론 효소 활성은 일반적으로 주형 DNA의 성질, 2가 양이온의 농도, 염의 농도 등에도 영향을 받는다(Toshida *et al.*, 1976). Polymerase 활성 측정을 위한 반응 용액에는 대부분 고농도의 Mg<sup>2+</sup> 이온이 포함되는데, 다음은 같은 양이온인 polyamine이 효소 활성에 미치는 Mg<sup>2+</sup> 이온의 영향을 대처하거나, 더 부가적인 효과를 나타내는지에 대하여 알아보았다(Table 2). Polyamine을 처리하지 않고 반응 용액내에 10 mM의 Mg<sup>2+</sup> 이온만 있는 경우의 효소 활성을 대조구로 하였을 때, Mg<sup>2+</sup> 이온이 전혀 들어가지 않으면 효소 활성은 대조구에 비해 30% 정도 감소하였다. 이때 Mg<sup>2+</sup> 이온 대신 그림 10.의 실험에서 최대로 효소 활성을 촉진시켰던 농도의 putrescine을 첨가하면 Mg<sup>2+</sup> 이온이 전혀 없을 때 보다 15% 정도 효소 활성을 촉진시켰다. 그런데 spermidine을 첨가했을 때에는 오히려 Mg<sup>2+</sup> 이온이 없을 때 보

다도 활성이 억제되었으며, spermine을 첨가하였을 때는 대조구에 비해 20% 정도 효소 활성을 촉진시켰다. 이는 polyamine이 최적 농도나 그 이하의 농도로 Mg<sup>2+</sup> 이온이 존재하는 상태에서만 *Plasmodium falciparum*에서 분리한 DNA polymerase 활성을 증가시킨다는 보고(Bachrach and Abu-Elheiga, 1990)와 일치한다.

이상의 결과에서 볼 때, 담배 세포(*Nicotiana tabacum* L.)에 있어서 polyamine의 결핍은 DNA 합성의 절대량과 속도의 감소를 유발시켰고, 외부에서 putrescine이 공급되면 회복되는 양상을 보였다. 이는 polyamine이 여러 측면에서 DNA 합성에 관여함을 의미한다. Polyamine이 DNA 합성과 관련된 효소들의 활성을 증가시키는 것은 polyamine에 의하여 야기된 DNA 구조의 안정화가 여러 효소들이 작용을 나타내기에 유리한 방향으로 작용하며(Stewart, 1988; Conrad and Topal, 1989; Pösö and Kuosmanen, 1983), polyamine이 DNA 합성에 관련된 효소들의 조효소로 작용함으로써 translation 수준에서 조절작용을 나타낸다고 볼 수 있다(Bachrach and Abu-Elheiga, 1990). 또한 polyamine이 다른 양이온들에 대하여 완전한 대처 효과를 내지 못하는 것으로 보아 polyamine은 생체내에서 이들과는 별개의 기능을 나타낼 수 있으리라 생각되며(Celano *et al.*, 1989), 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

### 적 요

동시성 현탁 배양시킨 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 세포에서 putrescine의 생합성억제제인 DFMO와 DFMA를 처리하여 배양 시간에 따라 DNA 합성에 미치는 polyamine의 영향을 알아보았다. DFMO를 처리한 경우 배양 초기에 DNA 합성이 급격히 감소하지만 배양 후기에는 오히려 putrescine 수준이 회복되면서 급격히 증가한다. 그러나 DFMA를 처리한 경우 DNA 합성은 배양 초기에만 감소하고 대조구와 유사한 양상을 나타내었다. 그런데 putrescine 생합성억제제와 putrescine을 동시에 처리하면 두 경우 모두 억제제만을 처리했을 때에 비하여 높은 수준의 DNA 합성 양상을 볼 수 있었다. 한편, putrescine만을 처리했을 때에도 대조구에 비하여 10~20% 정도 DNA 합성이 증가하였다. 담배세포에서 부분 분리한 DNA polymerase의 효소 활성도 polyamine에 의하여 촉진되었는데 putrescine 5 mM, spermidine과 spermine은 각각 0.5 mM을 반응용액에 처리하였을 때 대조구에 비하여 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 반응용액에 Mg<sup>2+</sup> 이온이 없으면 polyamine에 의한 효소 활성의 촉진이 Mg<sup>2+</sup> 이온이 있을 때에 비하여 현저하게 나타나지 않았던 것으로 보아 polyamine은 생체내에서 양이온으로서 DNA 구조의 안정화 뿐

아니라 DNA 합성에 관련된 효소의 활성 촉진에도 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Amileni, A., F. Sala, R. Cella and S. Spadari. 1979. The major DNA polymerase in cultured plant cells: Partial purification and correlation with cell multiplication. *Planta* **146**: 521-527.
- Bachrach, U. and L. Abu-Elheiga. 1990. Effect of polyamines on the activity of malarial  $\alpha$ -like DNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* **191**: 633-637.
- Basu, H.S. and L.J. Marton. 1987. The interaction of spermine and pentamines with DNA. *Biochem. J.* **244**: 243-246.
- Basu, H.S., B.G. Feuerstein, D.F. Deen, W.P. Lubich, R.J. Bergern, K. Samejima and L.J. Marton. 1989. Correlation between the effects of polyamine analogues of DNA conformation and cell growth. *Can. Res.* **49**: 5591-5597.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Celano, P., C.M. Berchtold, F.M. Giardiello and R.A. Casero. 1989. Modulation of growth gene expression by selective alteration of polyamines in human colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **165**: 384-390.
- Cohen, E., S. Arad, Y.M. Heimer and Y. Nizrahi. 1984. Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. *Plant Physiol.* **74**: 385-388.
- Cohen, E., Y.M. Heimer and Y. Nizrahi. 1982. Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissue of tomato and potato plants. *Plant Physiol.* **70**: 544-546.
- Cohen, S.S. and M.L. Greenberg. 1981. Spermidine, an intrinsic component of turnip yellow mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 5470-5474.
- Conrad, M. and M.D. Topal. 1988. DNA and spermidine provide a switch mechanism to regulate the activity of restriction enzyme *Nae* I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 9707-9711.
- D'Orazi, D., D.S. Fracassini and N. Bagni. 1979. Polyamine effects on the stability of DNA-actinomycin D complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **90**: 362-367.
- Fillingame, R.H., C.M. Jorstad and D.R. Morris. 1975. Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**: 4042-4045.
- Fracassini, D.S., N. Bagni, P.G. Cionini and A. Bennici. 1980. Polyamine and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. *Planta* **148**: 332-337.
- Frink, I. and D.E. Pettijohn. 1975. Polyamine stabilize DNA folds. *Nature* **253**: 62-63.
- Gallo, C.J., R.A. Koza and E.J. Herbst. 1986. Polyamine and HeLa cell DNA replication. *Biochem. J.* **238**: 37-42.
- Goren, R., N. Palavan, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea-seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Heby, O. and L. Persson. 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *TIBS.* **15**: 153-158.
- Heimer, Y.M., Y. Mizrahi and U. Buchrach. 1979. Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cell. *FEBS Lett.* **104**: 146-148.
- Hung, D.T., L.J. Marton, D.F. Feen and R.H. Shafer. 1982. Depletion of intracellular polyamines may alter DNA conformation in 9L rat brain tumor cells. *Science* **221**: 368-370.
- Kevin, M.F. and R. Phillips. 1988. Polyamines in relation to growth in carrot cell culture. *Plant Physiol.* **88**: 224-227.
- Lin, P.C. 1985. Effects of methylglyoxal-bis(guanylhydrazone) and abscisic acid on polyamine metabolism in embryocotomized barley seeds. *Plant Growth Regulation* **3**: 247-268.
- Maki, H., S. Ando, H. Kodama and A. Komamine. 1991. Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. *Plant Physiol.* **96**: 1008-1013.
- Mikhailov, V.S. and I.M. Androsova. 1984. Effect of spermine on interaction of DNA polymerases- $\alpha$  from the loach (*Misgurnus fossilis*) eggs with DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **783**: 6-14.
- Nishinari, N. and L. Syöno. 1986. Induction of cell division synchrony and variation of cytokinin contents through the cell cycle in the tobacco cultured cell. *Plant Cell Physiol.* **27**: 147-153.
- Pfossier, M. 1989. Improved method for critical comparison of cell cycle data of asynchronously dividing and synchronized cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.* **134**: 741-745.
- Pösö, H. and M. Kuosmanen. 1983. Spermidine and spermine stimulate the activity of T4-DNA ligase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **117**: 217-222.
- Quigley, G.J., M.M. Teeter and A. Rich. 1978. Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**: 64-68.
- Robie, C.A. and S.C. Minocha. 1989. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. 1. The effect of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. *Plant Science* **65**: 45-54.



- Sala, F., B. Parisi, D. Burrioni, A.R. Amileni, G. Pedrali-Noy and S. Spadari. 1980. Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the  $\alpha$ -like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett.* **117**: 93-98.
- Sala, F., M.G. Galli, E. Nielsen, E. Magnien, M. Devreux, G. Pedrali-Noy and S. Spadari. 1983. Synchronization of nuclear DNA synthesis in cultured *Daucus carota* L. cells by aphidicolin. *FEBS Lett.* **153**: 204-208.
- Sanjeev, J., G. Zon and M. Sundaralingam. 1989. Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTACAC). *Biochemistry* **28**: 2360-2364.
- Shimamura, S., H. Hibasami, U. Kano, S. Watanabe, S. Suzuki and K. Nakashima, 1990. Modulation by polyamines of DNA-dependent DNA polymerase activity from human serum. *Int. J. Biochem.* **22**: 545-549.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Stevens, C. and J.A. Bryant. 1978. Partial purification and characterization of the soluble DNA polymerase from seedling of *Pisum sativum* L. *Planta* **138**: 127-132.
- Stewart, K.D. 1988. The effect of structural changes in a polyamine backbone on its DNA-binding properties. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152**: 1441-1446.
- Sunkara, P.S., P.N. Rao and K. Nishioka. 1977. Putrescine biosynthesis in mammalian cells: essential for DNA synthesis but not for mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**: 1125-1133.
- Torrigiani, P., D.S. Fracassini and N. Bagni. 1987. Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.* **84**: 148-152.
- Wilson, R.W. and V.A. Bloomfield. 1979. Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry* **18**: 2192-2196.
- Yoshida, S., S. Masaki and T. Ando. 1976. Effects of polyamines in *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase from calf thymus. *J. Biochem.* **79**: 895-901.

(1992. 8. 24 接受)