

합성 기질에 의해 형성된 Lambda Site-specific Recombination 중간 대사물의 분석

이나영 · 유승구*

연세대학교 공과대학 식품생물공학과 및 생물산업소재 연구센터

Analysis of Lambda Site-specific Recombination Intermediates Generated by Synthetic Substrates

Na-Young Lee and Seung-Ku Yoo*

Department of Food and Biotechnology, College of Engineering and Bioproducts Research Center,
Yonsei University, Sudaemum-ku, Seoul 120-749, Korea

Abstract — Integrase (Int) carries out the cutting and resealing of attachment (att) site DNA via a covalent Int-DNA intermediate. A family of synthetic substrate DNAs was designed to accumulate Int-DNA intermediate. Int-DNA intermediates accumulated by half substrate was analyzed by SDS-KCl precipitation and restriction digestion. The results showed that Int-half DNA intermediate was circular and contained covalently bound Int molecule. Int-DNA intermediates were also trapped with three other kinds of synthetic substrates.

박테리오파지 λ DNA가 대장균 숙주 DNA 안으로 통합될 때에 박테리오파지 DNA의 attachment P (attP) 자리와 숙주의 attachment B(attB) 자리 사이에 자리 특이적 recombination이 일어난다(1, 2). attP는 240 bp의 길이를 갖고 있으며 160 bp의 P arm, 82 bp의 P' arm, 그리고 core로서 구성되어 있다(3). attP 상에는 integration host factor(IHF) 결합부위와 함께 모두 일곱개의 integrase(Int) 결합부위가 있는데 이들은 core에 존재하는 core-type과 P와 P' arm에 위치하는 arm-type으로 분류된다(4). attB는 attP와는 달리 매우 간단한 구조를 갖고 있다. attB의 길이는 25 bp이며 2개의 core-type Int 결합부위가 서로 마주보는 형태로 위치한다(5). attB에는 IHF 결합부위나 arm-type Int 결합부위가 없으나 attP의 core와 동일한 15 bp 길이의 염기 배열이 있으며 이는 7 bp overlap 부위라 불리는 Int 절단 부위를 갖고 있다.

Int는 recombination을 주도하는 파아지 유래의 효소로서 strand exchange를 담당한다(Fig. 1). Int는 type I topoisomerase 활성이 있어 strand exchange 위치를 절단하고 일시적으로 DNA에 결합된 상태를 유지하며 recombination의 상대가 존재할 때 recombination을 수행한다. Int의 ligation 활성에 의해 re-

combination 반응은 종결된다(Fig. 1). Int는 두개의 독립적인 결합부위가 있고 이들의 특이성도 매우 다른 것으로 알려져 있다(6). Int의 amino 말단 부위는 arm-type 결합부위에 작용하고 carboxy 말단 부위는 core-type 결합 부위에 작용하는 것으로 보고되었다. 이러한 연구 결과는 Int가 DNA에 결합할 때 두개의 서로 다른 결합 부위를 이용하여 단백질 다리를 형성하므로 고차구조(intasome)를 갖는 단백질-DNA 복합체를 형성할 수 있음을 시사한다. 1986년 Richet 등(7)은 Int와 IHF가 supercoiling 형태를 취하는 attP DNA와 결합할 때, 고차구조를 형성한다고 보고하였다.

Int에 의해 수행되는 recombination 과정은 대략적으로 알려져 있으나 strand exchange의 작용기구는 분명히 이해되지 못하고 있다. Strand exchange의 작용기구를 연구하기 위해서는 recombination 중간체를 분리하고 이들의 특성을 분석해야 하는데 이들 중간체의 분리 자체가 용이하지 않다. 본 연구에서는 strand exchange의 작용기구를 분자 수준에서 이해하기 위하여 특수한 기질 DNA들을 사용해서 recombination 중간체의 축적을 유도하고 이들의 성질 분석을 시도하였다.

재료 및 방법

attP DNA의 제조

Key words: Lambda site-specific recombination, recombination intermediates, integrase

*Corresponding author

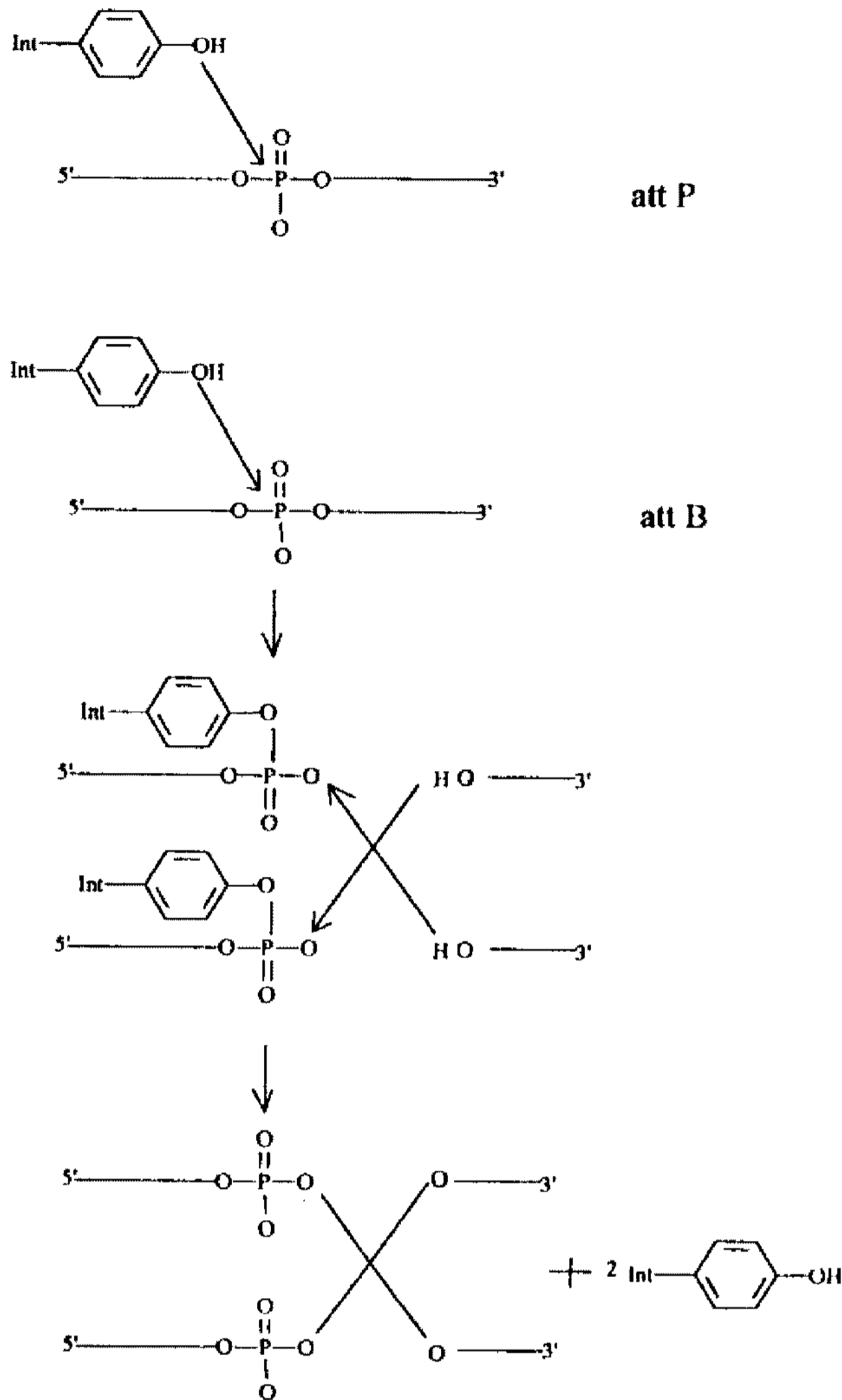


Fig. 1. Integrase mediated recombination.

본 실험에서는 attP DNA로서 λ attP 부위를 함유하고 있는 plasmid pSKY11(Yoo, unpublished data)을 사용하였다. *E. coli* HB101(pSKY11)의 배양액으로부터 plasmid maxi preparation protocol(Qiagen Co.)에 따라 plasmid pSKY11을 순수 분리하여 recombination 반응에 사용하였다.

합성기질의 재료

합성기질의 재료에는 Biosearch 회사(San Rafael, CA, U.S.A.)의 beta-amidite synthesis kit를 이용하여 합성한 oligonucleotide DNA를 사용하였다. 일반적으로 100~300 pmol의 상보적 oligodeoxynucleotide DNA들을 TE 용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA)에서 혼합한 후 75°C에서 10분간 가열한 후 약 1시간 동안 실온까지 서서히 냉각시켜 annealing 하였으며 에탄올 침전을 통하여 ds DNA를 회수하였다. Oligonucleotide의 5' 말단을 labeling 할 때는

[γ -³²P] ATP의 존재하에서 T4 polynucleotide kinase를 사용하였다. Recombination의 중간대사물인 Int-DNA 복합체를 얻기위한 half-attB 기질의 제조 시에는 2개의 상보적 oligonucleotide를, suicide-attB 기질의 제조시에는 3개의 적절한 oligonucleotide를 TE 용액 속에서 annealing 시켰다. 합성기질의 제조에 이용된 oligonucleotide의 염기배열은 Table 1에 나타난 바와 같다.

In vitro recombination

표준 recombination assay 용액(65 mM NaCl/25 mM MOPS, pH 7.9/6 mM spermidine/5 mM dithioerythritol/0.5 mg of bovine albumin serum per ml/0.1 pmol attP DNA/2 pmol attB DNA/2 unit Int/2 unit IHF) 20 μ l를 사용하여 in vitro recombination을 실시하였다. 표준 recombination 용액을 25°C에서 4 시간 동안 반응시킨 후 5 μ l의 종결용액(20% (w/v) ficoll-400, 5% sodium dodecyl sulfate, 0.5% bromophenol blue)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. Recombination 산물은 1.2%의 agarose gel 전기영동으로 분석하였다. 전기영동 후 gel은 진공 건조기를 이용하여 Whatman Diethylaminoethyl Cellulose(DE81) 용지 상에서 건조되었으며 이후 X-ray film 상에서 autoradiography를 행하였다.

SDS-KCl 침전

SDS-KCl 침전은 Trask 등(8)의 방법에 따라 행하였다. Recombination 산물에 SDS를 최종 농도가 1% 되도록 첨가한 후 실온에서 5분간 정치하였다. 이후 혼합액에 KCl을 최종 농도가 200 mM 되도록 첨가한 후 얼음 상에서 5분간 정치하고 원심분리하여 상등액(naked DNA)을 분리하였다. 침전물(covalent DNA-protein 복합체)에는 상등액과 동일한 양의 증류수를 첨가하여 현탁시킨 후 37°C에서 5분간 정치하였다. 얻어진 상등액과 침전물 현탁액에 대하여는 전기영동 분석을 행하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 사용된 half-attB 기질은 29 mer와 30 mer의 합성 oligonucleotide DNA를 hybridization 하여 제조하였으며 한 개의 core-type Int 결합부위와 overlap 부위 일부를 갖고있다(Table 1). Half-attB 기질에 Int 분자가 작용하여 절단부위를 절단하면 염기 세개의 작은 DNA 절편이 만들어지고 이 절편은 25°C에서 자연확산에 의해 half-attB 기질로부터 분

Table 1. Half-attB and suicide-attB substrates

Substrate	Structure	Length of oligonucleotide (nucleotides)
Half-attB		29/30
Suicide-attB I		29 + 29/58
Suicide-attB II		58/25 + 33
Suicide-attB III		58/28 + 30

↓ : cleavage site, (): nick, : overlap region, B, B': core-type binding site of Int

리된다(9). Int 분자는 half-attB 기질과 Int-DNA 복합체를 형성하게 되며 이는 recombination에 참여할 수 있는 구조로 알려져 있다(10). Int-DNA 복합체는 또 다른 Int가 attP를 절단함으로써 형성된 Int-attP 복합체와 쌍을 이루어 recombination을 행한다(Fig. 2).

Int-attP 복합체의 5'-OH기가 Int-half-attB 복합체의 공유결합을 친전자적으로 공격하면 Int-half-attB 복합체의 Int 분자가 분리되면서 attP와 attB 사이의 recombination이 일어나 attP와 attB가 결합된 recombination 중간체를 형성한다.

형성된 recombination 중간체는 int-attP-half-attB 복합체로서, 한개의 Int 분자가 attP DNA에 결합되어 있고 nick이 한개 존재하는 원 형태를 유지한다(product I)(Fig. 2). Int-attP-half-attB 복합체 내의 half-attB 유래 5'-OH기가 attP DNA에 결합되어 있는 Int 분자를 공격하여 recombination을 진행시킬 때는 꼬리가 달린 반지 모양의 recombinant 산물(product II)을 만든다. 한편 half-attB 유래의 5'-OH기가 attP DNA 중 Int와 결합하고 있지 않은 strand를 공격하면 Int가 결합된 선형 DNA가 형성된다(product III).

Product III 말단의 5'-OH기가 결합하고 있는 Int를 친전자적으로 공격하면 DNA 말단에 고리가 있는 선형 DNA를 형성한다(product IV)(Fig. 2). 본 연구에서는 half-attB 기질이 attP DNA와 recombination 될 때 형성되는 산물의 구조에 대한 정보를 얻기 위하여 SDS-KCl 침전을 행하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 recombination 산물의 대부분이 SDS-KCl에 의해 침전되었으므로 recombination 산물은 Int가 DNA와 결합되어 있는 protein-DNA 복합체(product I 또는 III, Fig. 2) 형태임을 알 수 있었다.

Recombination 산물을 제한효소인 *Pst*I과 *Hind*III로 각각 처리한 후 전기영동하였을 때는 band의 하향변화가 없었다. 이러한 결과는 recombination 산물이 선형도 아니며 supercoiling을 갖고 있는 원형도 아님을 의미한다. 분자량이 비교적 작은 DNA의 경우, 선형분자와 nick을 갖고 있는 relaxed 원형분자가 전기영동상에서 매우 유사한 mobility를 갖고 있는 점을 고려할 때 recombination 산물은 nick이 존재하는 relaxed 원형분자(product I, Fig. 2) 형태를 갖고 있는 것으로 판단된다. 한편 recombination 산물을 *Pst*I과 *Hind*III로 동시에 처리한 후 전기영동 하였을

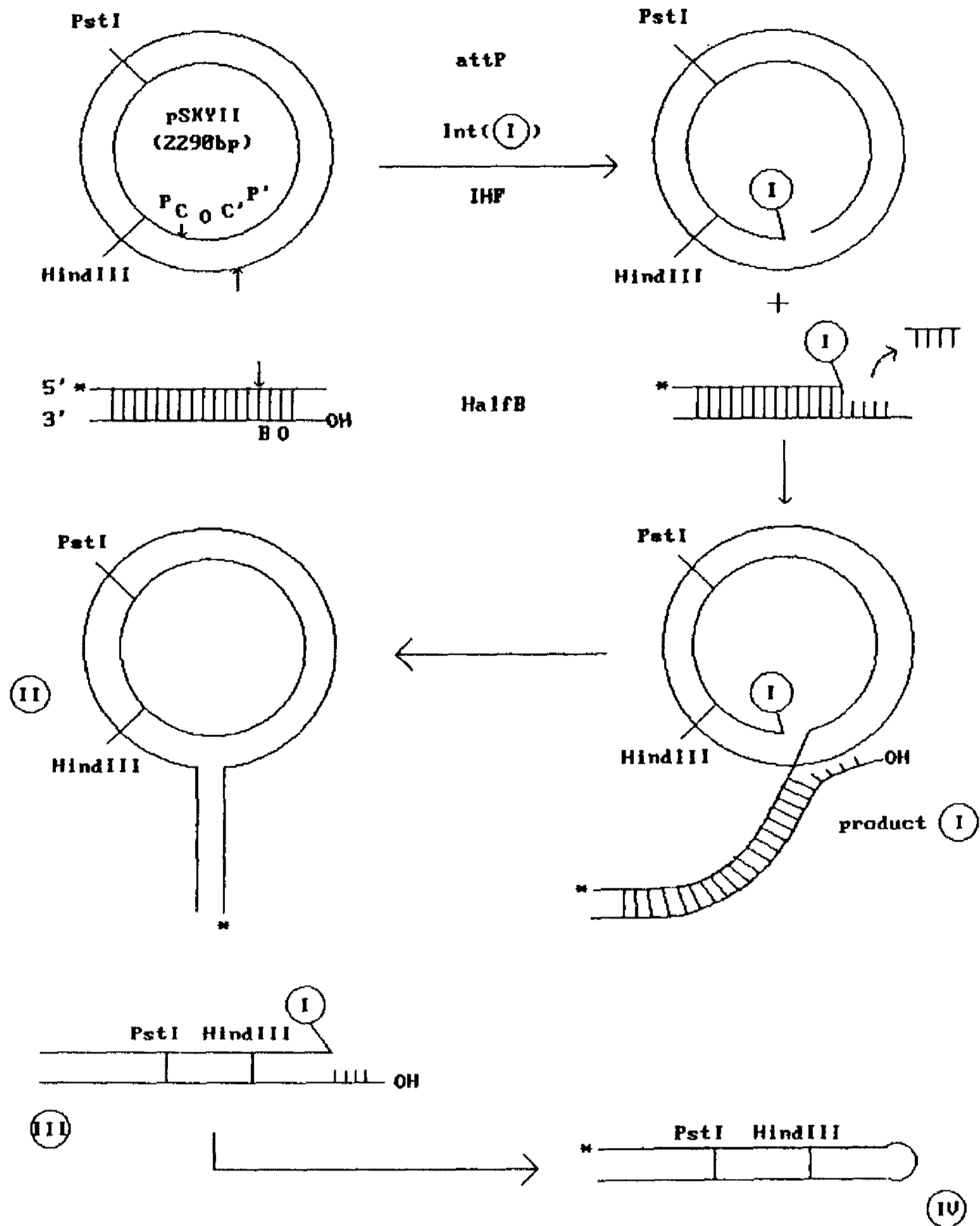


Fig. 2. Plausible pathways for recombination with half-attB substrate.

때는 band의 하향 변화(783 bp)가 있었다. 따라서 SDS-KCl 침전 결과와 제한 효소 처리 결과를 고려할 때 half-attB 기질과 attP DNA의 recombination 산물은 Int 분자가 결합된 원형의 DNA-protein 복합체 (product I, Fig. 2)인 것으로 판단되었다. Int-attP-half-attB 복합체가 형성되기 위하여 한번의 strand exchange가 있었으므로, 네번의 strand exchange가 필요한 attP×attB recombination 과정을 고려할 때, Int-attP-half-attB 복합체는 1/4의 recombination 과정이 진행된 후 얻어진 recombination 중간체라고 말할 수 있다.

λ DNA recombination은 overlap 부위에 nick을

갖고 있는 기질(suicide 기질)에 의해 recombination 중간체가 형성된다고 보고되었다(11). 본 연구에서는 세가지 종류의 suicide 기질들(Table 1)을 제조하여 attP와의 recombination을 행하였다. Suicide 기질 I, II 그리고 III 모두 attP DNA와 recombination 되었다 (Fig. 4). 이들 recombination 산물의 대부분은 SDS-KCl에 의해 침전되었으므로(data not shown) suicide 기질들에 의해 형성된 산물도 Int를 갖고 있는 Int-DNA 복합체인 것으로 생각되며, recombination 과정 중 각기 다른 지점에서 중단되어 다양한 recombination 중간체를 형성하였을 가능성이 크다. Suicide 기질 I(lane B)의 상단 strand의 절단부위가 Int에

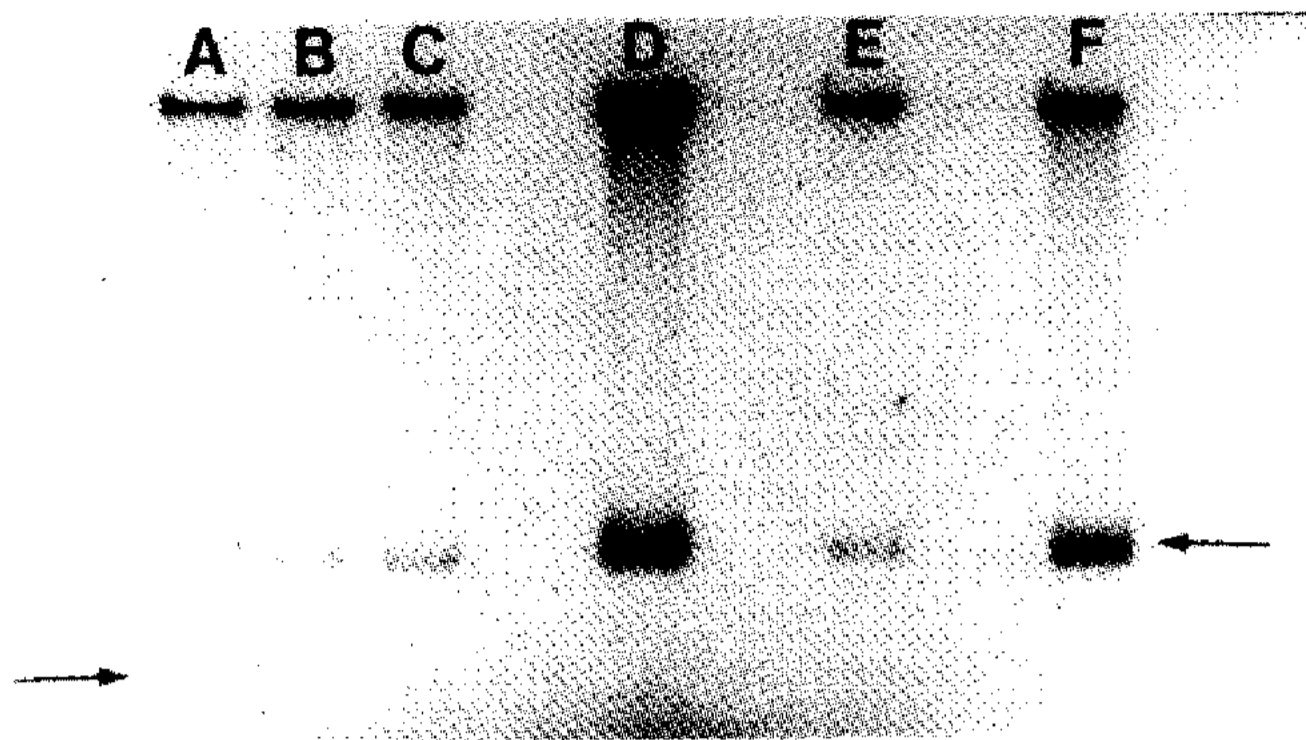


Fig. 3. Analysis of attP \times half-attB substrate recombination products.

A. *Pst*I and *Hind*III double digestion of recombination products, B. *Hind*III digestion of recombination products, C. *Pst*I digestion of recombination products, D. Intact recombination products, E. Supernatant from SDS-KCl precipitation of recombination products, F. Precipitate from SDS-KCl precipitation of recombination products.

Half-attB DNA is not shown. Arrows indicate recombination products.

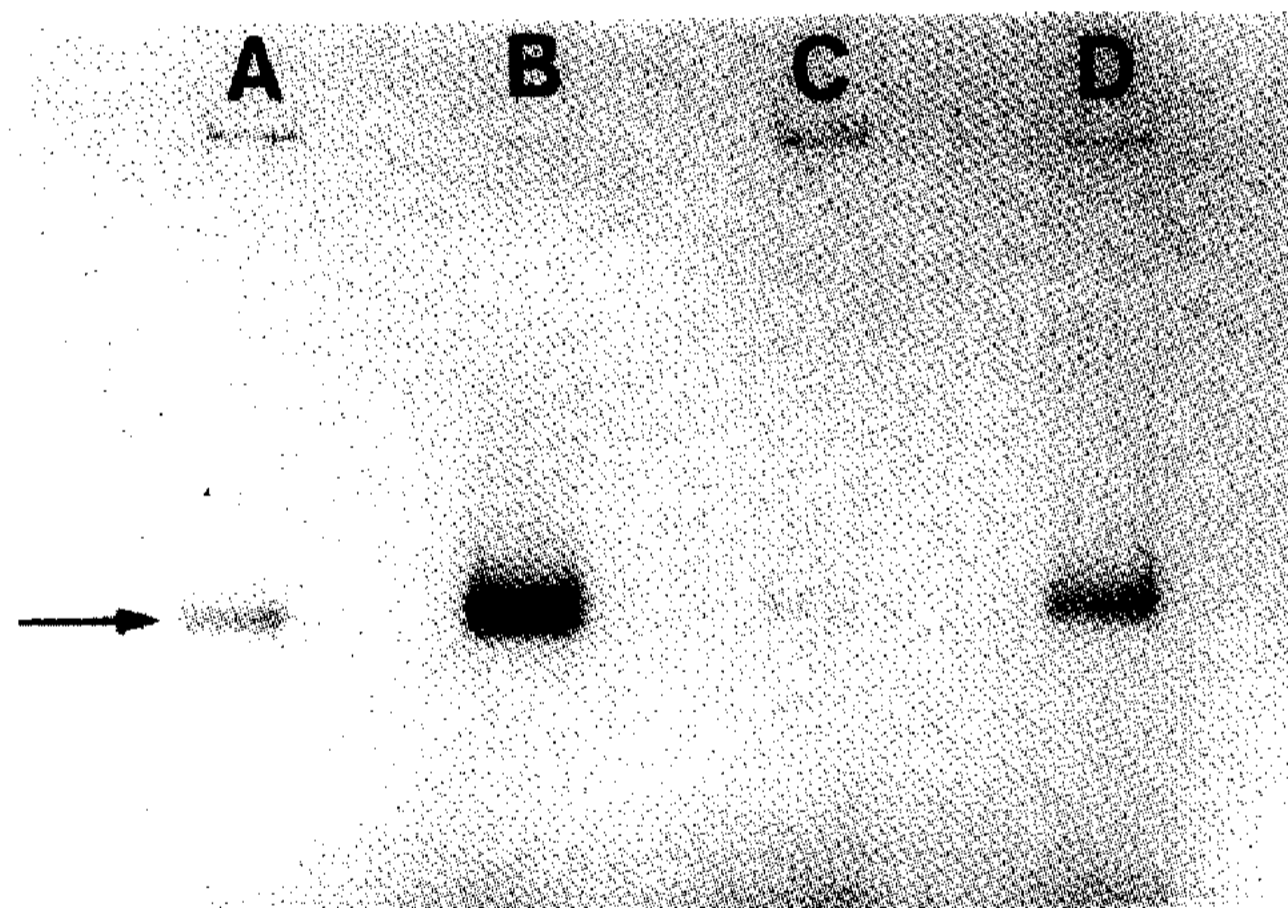


Fig. 4. Recombination products of attP \times suicide-attB substrate.

A. Half attB substrate, B. Suicide attB substrate I, C. Suicide attB substrate II, D. Suicide attB substrate III. Half-attB and suicide attB substrates are not shown. Arrow indicates recombination products.

의해 절단되면 half-attB 기질 경우와 마찬가지로 염기 세개의 작은 DNA 절편이 만들어져 기질로부터 분리되므로 한번의 strand exchange 만이 가능하다. Suicide 기질 I은 recombination 효율면에서 half-attB 기질(lane A)보다 높은 것으로 나타났다. Suicide 기질은 attB의 core 부위(BOB')를 모두 갖고 있어 Int에 대한 친화력이 half-attB 기질보다 높을 가능성이 있다. Suicide 기질 II(lane C)는 다른 합성기질들에 비해 매우 낮은 recombination 효율을 보여주었으며, suicide 기질 II의 하단 strand의 절단부위에 위치한 nick

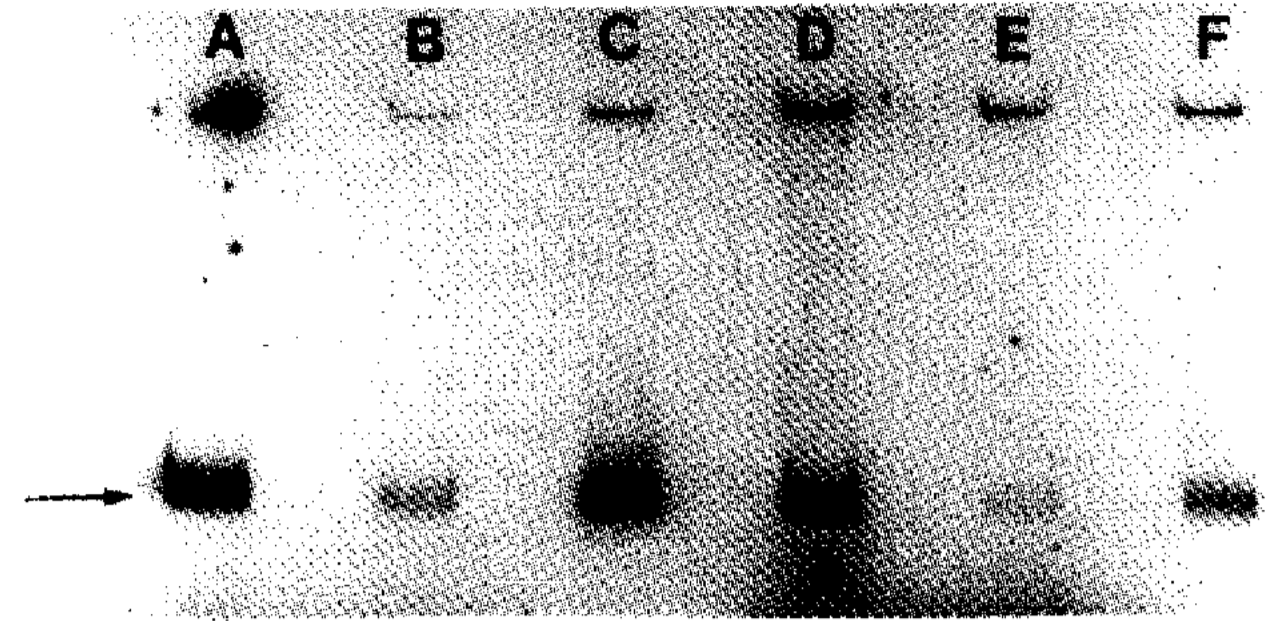


Fig. 5. SDS-KCl precipitation of attP \times suicide-attB substrate III recombination products.

A. Intact of recombination products from top strand-labeled suicide attB substrate III, B. Supernatant of recombination products from top strand-labeled suicide attB substrate III, C. Precipitate of recombination products from top strand-labeled suicide attB substrate III, D. Intact of recombination products from bottom strand-labeled suicide attB substrate III, E. Supernatant of recombination products from bottom strand-labeled suicide attB substrate III, F. Precipitate of recombination products from bottom strand-labeled suicide attB substrate III.

Suicide-attB DNAs are not shown. Arrow indicates recombination products.

(Table 1)이 recombination 효율에 관계하는 것으로 생각된다. Suicide 기질 III(lane D)은 하단 strand의 overlap 부위 안에 nick을 갖고 있는 기질로서 suicide 기질 I보다는 낮은 recombination 효율을 나타내었으며 그 이유는 분명하지 않다. 그러나, suicide 기질 III은 nick이 하단 strand에 위치하고 두개의 Int cleavage 부위가 존재하므로 이론적으로는 세번의 strand exchange가 가능한 기질이다. 따라서 suicide 기질 III은 recombination 과정을 연구하는 데에 매우 유용한 것으로 생각된다.

Suicide 기질 III의 상단 strand와 하단 strand가 모두 recombination에 참여하는지 여부를 확인하기 위하여 suicide 기질 III의 상단 strand와 하단 strand를 각각 labeling 하여 attP와 반응시키고 SDS-KCl 침전을 행한 후 상등액과 침전물을 전기영동으로 분석하였다(Fig. 5).

두가지 종류의 기질 모두 Int-DNA 복합체를 형성하였으며, 이는 suicide 기질의 상단과 하단 strand가 모두 recombination에 참여함을 시사한다.

Suicide 기질들과 half-attB 기질을 이용하여 recombination 중간체를 추적하고 이들을 다양한 방법으로 분석한다면 λ recombination 경로에 대한 중요한 정보를 얻게 될 것으로 기대된다. 한편 λ Int는 Int-specific DNA sequence와 결합, 절단하고 Int의 카르복시 말단 부분의 tyrosine residue와 절단된

DNA의 3' 말단 사이에 phosphodiester linkage를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 Int의 특성을 고려할 때, 다른 peptide(또는 protein)과 아미노 말단 부분에 fusion protein을 형성하고 있는 peptide-Int도 Int-specific DNA sequence와 결합, 절단하여 protein-DNA complex를 형성할 가능성이 높다. 따라서 Int의 유전자에 random DNA sequences를 결합시키는 gene fusion 방식을 이용하여 다양한 종류의 peptide-Int 단백질을 발현시켜 이들이 Int-specific DNA sequence와 결합하도록 유도함으로써 peptide-Int-DNA complex 형태의 라이브러리를 제조할 수 있는 가능성이 있다.

요 약

Bacteriophage Lambda Integrase(Int)는 strand exchange 위치를 절단하고 일시적으로 DNA에 결합하여 Int-DNA 중간체를 형성하며, recombination의 상대가 존재할 때 recombination을 수행한다. 본 연구에서는 특수한 기질 DNA들을 사용해서 Int-DNA 중간체(recombination 중간체)의 축적을 유도하고 이들의 성질 분석을 시도하였다.

Half substrate에 의해 축적된 Int-DNA 중간체를 SDS-KCl 침전과 제한효소 절단 방법으로 분석한 결과, Int-DNA 중간체는 원형이며 Int 분자가 공유결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 세가지의 다른 합성 기질도 Int-DNA 중간체를 축적하였다.

감사의 말

본 논문은 한국과학재단지정 연세대학교 생물산업 소재연구센터의 연구비 지원(과제번호 94-02-03-1)에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regula-

- tory aspects of λ site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 913-949.
2. Nash, H.A. 1981. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservative site-specific recombination. *Ann. Rev. Genet.* **15**: 143-167.
3. Hsu, P.L., W. Ross, and A. Landy. 1980. The lambda phage att site: functional limits and interaction with Int protein. *Nature.* **285**: 85-91.
4. Ross, W. and A. Landy. 1982. Bacteriophage λ int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 7724-7728.
5. Mizuuchi, M. and K. Mizuuchi. 1985. The extent of DNA sequence required for a functional bacterial attachment site of phage lambda. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1193-1208.
6. Moitoso de Vargas, L., N.M. Pargellis, Hasan, E. W. Bushman, and A. Landy. 1988. Autonomous DNA binding domains of λ integrase recognize different sequence families. *Cell* **54**: 923-929.
7. Richet, E., P. Abcarian, and H.A. Nash. 1986. The interaction of recombination proteins with supercoiled DNA: defining the role of supercoiling in lambda integrative recombination. *Cell* **46**: 1011-1021.
8. Trask, D.K., J.A. DiDonato, and M.T. Muller. 1984. Rapid detection and isolation of covalent protein-DNA complexes: application to topoisomerase I and II. *EMBO. J.* **3**: 671-676.
9. Pargellis, C.A., S.E. Nunes-Düby, L. Moitoso de Vargas, and A. Landy. 1988. Suicide recombination substrates yield covalent λ integrase-DNA complexes and lead to identification of the active site tyrosine. *J. Biol. Chem.* **263**: 7678-7685.
10. Nunes-Düby, S.E., L. Matsumoto, and A. Landy. 1989. Half-att site substrates reveal the homology independence and minimal protein requirements for productive synapsis in λ excisive recombination. *Cell* **59**: 197-206.
11. Nunes-Düby, S.E., L. Matsumoto, and A. Landy. 1987. Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. *Cell* **50**: 779-788.

(Received 20 February 1995)