DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(*Journal of the Korean Chemical Society*)
Vol. 29, No. 6, 1985
Printed in the Republic of Korea

RNase A에 對한 RNA의 加水分解反應性에 미치는 Spermine의 抑制効果

李璨容 · 金興均 · 高東成†
忠南大學校 理科大學 化學科
(1985. 1. 22 접수)

Inhibitory Effect of Spermine on the Susceptibility of RNA for RNase A

Chan Yong Lee, Heung Kyun Kim, and **Thong-Sung Ko†**
Department of Chemistry, College of Sciences, Chungnam National University, Dae Jeon 300-31, Korea
(Received January 22, 1985)

要 約. RNase A에 對한 RNA의 加水分解反應性은 spermine에 의하여 抑制되었다. Spermine의 濃度가 增加함에 따라 RNase의 活性度는 점점 減小하다가 plateau에 到達되었다. 同一한 條件에서 spermine의 濃度가 增加함에 따라 RNA의 粘性度는 점점 增加되어 RNase의 活性度에서의 spermine 依存性과 같이 plateau에 이르게 되었다. RNase A에 對한 RNA의 加水分解反應性에 미치는 spermine의 抑制効果는 denatured(變性) DNA에 의하여 救濟되나 native(本性) DNA에 의하여서는 無關하였다. 이들 實驗結果는 spermine에 의하여 RNA의 分子間 aggregation이 일어나며 그로 因하여 RNA의 RNase A에 對한 加水分解反應性이 抑制될 수 있음을 보여준다.

ABSTRACT. RNA degradation by riboinuclease A (EC 3.1.27.5) was inhibited by spermine. As the concentration of spermine was increased, the ribonuclease activity was decreased gradually until it reached an plateau, Under the same conditions, the viscosity of the RNA increased, as the spermine concentration was increased until it reached a plateau in the same manner as the profile of the spermine-dependent ribonuclease activity. The inhibitory effect of spermine on the susceptibility of RNA to the ribonuclease could be relieved by denatured calf thymus DNA, but not by the native DNA. The data here indicate the possibility that the suppress of the RNA susceptibility for the ribonuclease by spermine is brought about by the spermine-induced intermolecular aggregation of the RNA molecules.

序 論

前에 報告된 바에 의하면 polyamine에 의하여 ribonuclease(RNase)의 activity가 增加되며 base specificity가 달라진다고 한다[1~3]. 이러한 polyamine 効果는 polyamine에 의하여 誘發되는 RNA의 構造變移에 基因할 것이라고 豫想되나 이에 對한 硏究가 이루어지지 않고 있다. 이를테면 Igarashi 等은[3] polyamine이 RNA의 3次元的 構造變移에 미치는 効果는 전혀 생각해 보지 못한 채 合成 polynucleotides (poly A, poly C 및 poly U)의 E. coli RNase II에 의한 加水分解에 對한 差別的 効果를 觀察하고 이러한 差別的 効果가 單純히 polyamine의 RNA에 對한 base specificity에 基因한다고 報告하고 있다. 또한 著者들은[4,5] 前에 polyamine이 native(本性) DNA와 dena-

tured(變性) DNA의 DNase 1에 對한 相反된 効果, 즉 本性 DNA의 susceptibility는 增加시키는 反面 變性 DNA의 susceptibility는 抑制(inhibition) 시킴을 알았으며 이와같은 相反된 効果는 本性 및 變性 DNA에 對한 spermine의 差別的 構造變移 効果에 基因하기 때문이라고 推理할 수 있었다. Spermine에 의하여 本性 DNA는 monomolecular condensation을 일으켜 compact 構造를 形成하지만 變性 DNA는 이와 對照的으로 分子間 aggregation을 일으키는 傾向을 가졌음을 알았으며, DNase 1에 對한 變性 DNA susceptibility의 spermine에 의한 妨害効果는 分子間 aggregation에 基因함을 推理할 수 있었다. 變性 DNA와 類似하게 double helical 構造가 결핍되어 있는 RNA도 spermine에 의하여 構造的 變移가 誘發됨으로써 RNase에 對한 susceptibility가 달라질 것인가는 흥미로운 問題이다.

따라서 本 硏究에서는 spermine이 RNA의 viscosity 및 RNase A에 對한 susceptibility에 미치는 効果를 調査하고 denatured DNA가 이 susceptibility에 미치는 影響을 調査함으로써 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility가 spermine에 의하여 妨害됨을 알아내고 이 妨害効果가 spermine에 의한 aggregation에 基因할 것임을 推理하여 그 結果를 報告한다.

實驗方法 및 材料

송아지 흉선 (calf thymus) DNA (Type I), RNA(Baker's yeast로부터 精製된 것, Type XI), ribonuclease A (RNase A, Type 1-AS), deoxyribonuclease 1 (DNase 1, DN-100), 및 spermine tetrahydrochloride는 모두 美國 Sigma Chemical Company로 부터 購入된 것이며 熱變性 DNA는 波長 260nm에서의 吸光度가 1.6이 되는 DNA 水溶液을 끓는물 속에서 20分間 加熱한 後 얼음물에서 急冷却시켜 製造하였다.

RNA의 RNase A에 對한 Susceptibility 測定. 前에 發表된 McDonald의 方法을[2] 약간 修訂하여 酵素反應速度를 測定하였다. 標準 acetate buffer(0.005 *M* NaCl, 0.03 *M* $MgCl_2$ 및 0.008 *M* acetate), pH 7에 녹아있는 1.9 m*l* RNA 溶液에 RNase 水溶液 0.1 m*l*을 넣어 섞어주고 25 °C에서 20分間 反應시킨 後에 0.15 *M* NaCl 內 carrier 蛋白質 溶液 0.1 m*l*을 加한 後 곧 이어 0.25% uranyl acetate를 含有하는 5% perchloric acid 2 m*l*을 加하여 얼음물에 15分間 담가 두었다가 遠心分離器로 沈澱을 除去시킨 上澄液의 吸光度를 波長 260 nm에서 測定하였다. Spermine이 standard acetate buffer 內 RNA의 viscosity에 미치는 影響에 對한 實驗은 恒溫槽 溫度 25 °C에서 Ostwald type viscometer를 使用하여 前에 報告된 方法[5]에 따라 遂行하였다.

結 果

基質인 RNA의 濃度 增加에 따른 RNA의 分解速度에 對한 data를 보여주는 *Fig.* 1에서 spermine이 存在하지 않는 경우와 存在하는 경우 (5×10^{-3} *M*) 各各 다른 樣相을 가짐을 알 수 있다. Spermine이 存在하지 않을 경우에는 試驗된 RNA 濃度 範圍內에서 그 分解速度(上澄液內 分解 遊離되는 酸可溶性 生成物의 260nm에서의 吸光度)가 RNA 濃度 增加에 따라서 直線的으로 增加하지만 이와 對照的으로 spermine이 存在할 경우에는 RNA의 susceptibility가 抑制됨을 알

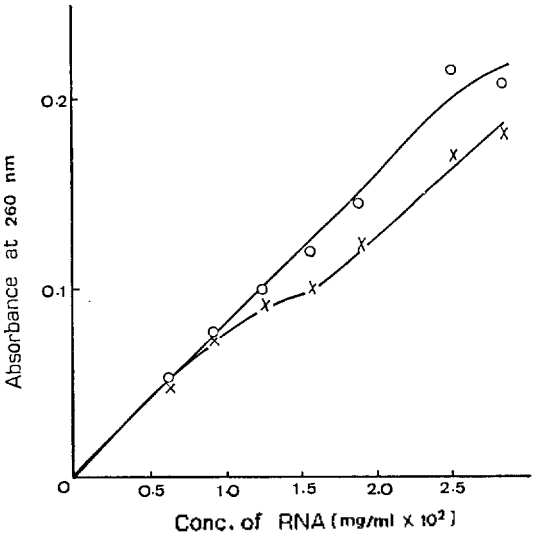

Fig. 1. RNase A Activity vs. RNA concentration in presence($5\times10^{-3}M$, -×-×-) and absence(-○—) of spermine. The assay conditions and procedures are as described under "Materials and Methods".

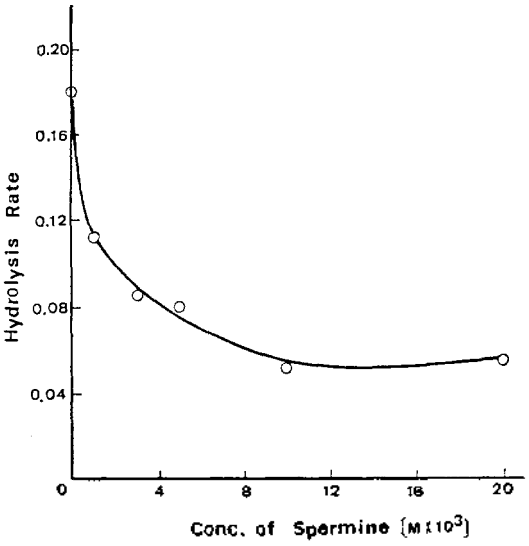

Fig. 2. The dependence of the susceptibility of RNA for RNase A on the spermine concentration. The values of hydrolysis rate expressed are those of absorbance increase at 260nm per 20min incubation. The concentration of RNA was 6.25×10^{-2}mg/m*l*. Further experimental details are as described in the text.

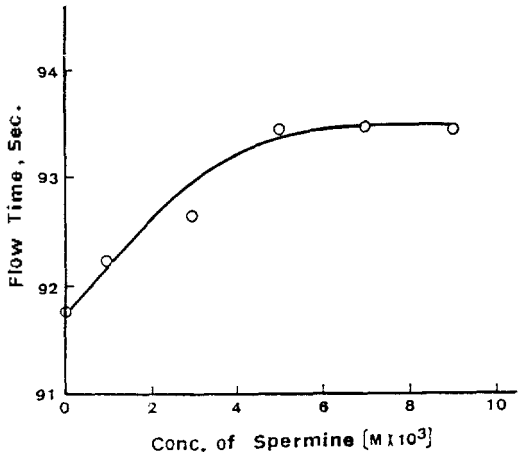

Fig. 3. Effect of spermine concentration on the viscosity of RNA in the standard acetate buffer at 25 °C. The values of viscosity are expressed by flow time(sec.) The concentration of RNA was kept constant at 6.25×10^{-2}mg/m*l*.

수 있다. 그리므로 spermine이 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility에 미치는 影響을 調査한 바 *Fig.* 2에서 보여주는 바와 같이 抑制効果가 있음을 알 수 있다. 즉 Spermine의 濃度 增加에 따라서 RNA의 susceptibility가 점점 감소하여 plateau에 到達됨을 알 수 있다. Spermine의 이 抑制効果에 對한 mechanism을 알기 위하여 spermine 濃度 變化에 對한 RNA의 viscosity 變化 樣相을 調査하였으며 *Fig.* 3에서 그 結果를 보여준다. *Fig.* 3에서 spermine의 濃度가 增加함에 따라서 RNA의 粘性度가 점점 커져서 plateau에 到達됨을 알 수 있다. Spermine의 濃度 增加에 따른 RNA의 viscosity 增加는 denatured DNA의 경우[5]와 마찬가지로 spermine에 의한 RNA 分子間 aggregation이 일어나기 때문이라고 생각할 수 있다. 그 두 樣相 즉 spermine의 濃度 變化에 對한 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility 變化 樣相(*Fig.* 2)과 viscosity 變化 樣相(*Fig.* 3) 間에 相關關係가 存在함을 알 수 있으며 이 相關關係로 부터 spermine에 의한 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility의 抑制効果는 denatured DNA의 DNase 1에 對한 susceptibility의 spermine에 의한 抑制効果의 경우[5]와 같이 RNA의 spermine에 의한 分子間 aggregation에 基因하는 것으로 풀이된다. *Fig.* 2 및 *Fig.* 3에서 spermine의 濃度가 약 $8\times10^{-3}M$에 이르면 그 濃度가 더 이상 增加되어도 RNA의 susceptibility나 viscosity가 더 이상 감소되거나 增加되지 않고 plateau에 이르는 이유는 RNA의 濃度가 一定하므로 spermine에 의하여 完全히 飽和되어 aggregate를 形成할 경우 spermine 濃度가 그 이상 增加되어도 aggregation의 정도가 그 이상 增加되지 않으므로 spermine 濃度가 增加되어도 RNA의 susceptibility가 그 이상 變化되지 않고 plateau에 이른다고 생각된다. RNase A에 對한 RNA susceptibility *vs.* RNA 濃度를 보여주는 *Fig.* 1에서 RNA 濃度 增加에 따른 그 susceptibility 增加率은 spermine이 存在할 경우가 存在하지 않는 경우 보다 낮아짐을 알 수 있는데 그 이유는 spermine이 存在할 경우 濃度 增加에 따른 aggregate 정도가 增加되기 때문이라고 解釋된다.

Spermine이 存在하는 경우 ($5\times10^{-3}M$) 및 存在하지 않는 各 경우 denatured DNA가 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility에 미치는 影響을 보여주는 *Fig.* 4에서 spermine에 의한 RNA의

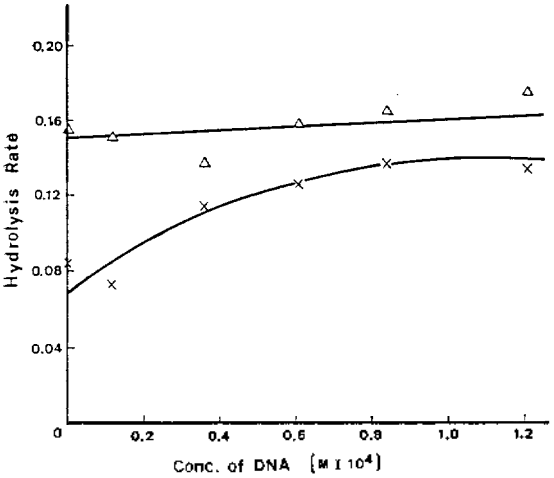

Fig. 4. Effect of denatured DNA concentration on the susceptibility of RNA for RNase A in presence ($5\times10^{-3}M$) and absence of spermine. The values of hydrolysis rate expressed are those of absorbance increase at 260nm, per 20min incubation, The concentration of RNA was 6.25×10^{-2} mg/m*l*. Further experimental details are as described in the text. ×——×; denatured DNA plus spermine. △——△; denatured DNA minus spermine.

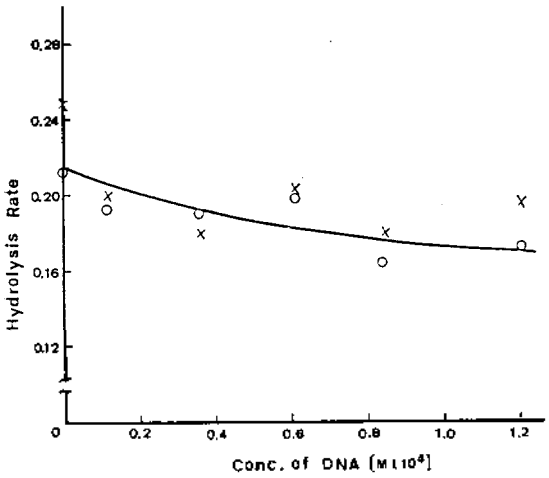

Fig. 5. Effect of native DNA concentration on the susceptibility of RNA for RNase A in the presence ($5\times10^{-3}M$) and absence of spermine. Other experimental conditions are as described in *Fig.* 2. ×——×: native DNA plus spermine. ○----○: native DNA minus spermine.

RNase A에 對한 susceptibility의 抑制效果가 denatured DNA에 의하여 救濟됨을 알 수 있다. 그러나 反面에 spermine이 存在하는 경우 ($5\times10^{-3}M$) 및 存在하지 않는 各 경우 native DNA가 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility에 미치는 影響을 보여주는 *Fig.* 5에서 native DNA는 denatured DNA의 경우와는 달리 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility에 큰 影響을 미치지 않을 뿐 만 아니라 spermine의 存在 與否에 無關함을 알 수 있다. 前에 著者들이 遂行한 硏究結果[4,5]에 의하면 denatured DNA는 native DNA와는 對照的으로 spermine에 의한 intermolecular aggregation에 銳敏하며 따라서 DNase 1에 對한 susceptibility가 spermine에 依하여 抑制됨을 推理할 수 있었다. 따라서 分解反應性 및 viscosity에 있어서 spermine의 影響이 RNA 및 denatured DNA에 對하여 類似한 점으로부터 미루어 보아 RNase A에 對한 spermine의 妨害效果로부터 denatured DNA에 依한 救濟效果는 spermine에 의하여 誘發되는 RNA-dDNA(denatured DNA) 間의 aggregation으로 말미암아 spermine에 의한 RNA 分子間 aggregation이 減小되기 때문이라고 推測된다.

結論的으로 本 硏究 data로부터 spermine에 의하여 RNA의 分子間 aggregation이 일어나며 그로 因하여 spermine에 依한 RNA의 RNase A에 對한 susceptibility의 抑制效果가 일어난다고 볼 수 있다.

考 察

in vivo 및 *in vitro*에서 spermine 等의 polyamines에 의한 RNA 分解酵素의 阻害가 많이 報告되고 있으나[6~9] 그 mechanism에 對해서는 아직 알려진 바 없다. Levy 等은[9] E. coli RNase II에 의한 synthetic homopolynucleotides의 分解 activity에 그 種類에 따른 差別的 polyamine 效果가 있음을 報告하였으나 이들은 polyamines가 이러한 條件들에서 이들 RNA species의 3次元的 構造에 미치는 效果를 調査하지 않고 RNase activity에 對한 polyamines의 觀察된 差別的 效果를 一般化된, heteropolynucleotide의 base specificity에 適用시켰다. 그러나 이러한 경우 polyamine에 의한 base specificity의 變化 보다는 base sequence specificity에 따른 3次元的 構造

變化의 差異에 의하여 그 susceptibility에 對한 差別的 polyamine 効果가 생길수 있으므로 homopolynucleotides의 種類에 따른 polyamine의 差別的 効果를 polyamine에 의한 單純한 base specificity 變化에 基因한다고 생각하여 다른 種類의 RNA heteropolynucleotide에 適用시켜서는 안 될 것이다. 따라서 RNA의 分解 activity(susceptibility)에 미치는 差別的 polyamine 効果의 研究에는 polyamine에 의한 RNA의 3次元的 構造變化에 對한 研究가 重要함을 알 수 있다.

本 研究結果는 polyamines의 RNase activity에 미치는 影響이 RNA의 3次元的 構造에 미치는 影響의 結果에 基因함을 보여 줌으로써, RNase에 對한 RNA species의 susceptibility에 미치는 polyamines의 差別的 効果 機構를 研究함에 있어서는 polyamines가 RNA의 3次元的 構造에 미치는 効果를 調査하는 것이 重要하다는 점을 强調한다. 또한 本 研究結果는 spermine 等에 의하여 誘發되는 RNA 및 DNA間의 aggregation 可能性을 示唆하여 준다.

本 論文은 部分的으로 1984年度 文敎部 基礎科學 特性化 分野 學術研究助成費에 依하여 研究되었음.

引 用 文 獻

1. C.C. Levy, W.E. Mitch, and M. Schmukler, *J. Biol. Chem.*, **248**, 5712 (1973).
2. K. Igarashi, H. Kumagai, Y. Watanabe, N. Toyoda, and H. Hirose, Biochem. *Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1070 (1975).
3. K. Igarashi, H. Kumagai, Y. Watanabe, and H. Hirose, "Advances in Polyamine Research", Vol. I, p. 267, R.A. Campbell, *et al.*, Raven Press, New York, U.S.A., 1978.
4. T.S. Ko, J. Huh, C.B. Lee, and M.K. Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **27**(6), 429 (1983).
5. T.S. Ko and J. Huh, *J. Korean Chem. Soc.*, **28**(1), 70 (1984).
6. T. Sakurada and H. Matsumura, *J. Biochem.* (Japan), **56**, 208 (1964).
7. M.K. Brakke and N. Van Pelt, Virology, **39**, 516 (1969).
8. V.A. Erdmann, G.A. Thomas, H.W. Norton, and E.J. Herbst, *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 43 (1968).
9. R.K. Datta, S. Sen, and J.J. Ghosh, *Biochem. J.*, **114**, 847 (1969).