

*Chlamydomonas reinhardtii*로부터 분리, 정제된 DNA Methyltransferase 활성화에 대한 Polyamine의 영향

李明玟·李舜熙

(연세대학교 이과대학 생물학과)

Effect of Polyamines on purified DNA Methyltransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*

Lee, Myung Min and Sun Hi Lee

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

DNA methyltransferase was purified 282.6-fold from *Chlamydomonas reinhardtii* 21gr (mt⁺) gametic cell to examine the effect of polyamine on the enzyme activity. Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) revealed at least three bands(1 major band, 2 minor bands). Among these, the major band represents DNA methyltransferase. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.1% sodium dodecylsulfate(SDS-PAGE) revealed a major band with M.W. 60,000.

DNA methyltransferase activity was inhibited more effectively by spermine than by spermidine, and the inhibition by putrescine was smaller than spermine and spermidine. DNA methyltransferase activity was inhibited by 40% and 53% at 5mM and 20mM spermine, respectively. In the case of spermidine, the inhibition was 35% at 10mM and 44% at 20mM. However, the inhibition by putrescine appeared only above 5mM and reached about 25% at 20mM.

서 론

Isogamous 단세포 녹조류인 *Chlamydomonas*는 염색체 유전자의 모성유전에 대한 모델로써 연구되고 있다(Sager, 1954; Gillham, 1974). *Chlamydomonas* 모성유전에 대한 기작은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 몇가지 가설이 제안되어 있다. 첫째로 원핵생물에서 볼 수 있는 modification-restriction system을 진핵세포에서의 모성 유전에 적용시켜 설명하는 가설(Sager and Ramannis, 1973)과 둘째로 multicopy model(Gillham, 1974)이 제안되어 있으며 최근 coupled endonuclease and exonuclease 가설, 즉 active digestion 가설(Kuroiwa, 1985)이 제안되었다. 이중 restriction-modification 가설은 *Chlamydomonas*의 life cycle에 따른 자성염색체 DNA의

methylation 정도의 변화(Williamet *et al.*, 1979)에 의해 어느 정도 뒷받침되고 있으며 DNA methyltransferase의 존재도 확인(Sano and Sager, 1980)되었다. 그러나 아직 가정되는 제한 효소가 밝혀지지 않고 있고 DNA methyltransferase의 분리도 아직 완전히 이루어지지 못해 이 DNA methyltransferase의 성격이 규명되어 있지 않으며 엽록체 유전자가 모성유전될 때의 조건에서 효소활성도의 변화 등 모성유전과의 관계가 확립되어 있지 않다. DNA methyltransferase는 현재 두가지 종류가 *Chlamydomonas*에 존재하며 이중 한종류는 응성과 자성의 영양생장기 세포와 배우체시기 세포에 존재하며 다른 하나는 자성의 배우체시기 세포와 접합체에만 존재하고 있는 것으로 보고되어 있다(Sano and Sager, 1980). 이중 후자가 모성유전에 관련되는 것으로 추정되고 있다. 그러나 배우체 시기 자성엽록체 유전자의 methylation이 모성유전과 관계가 없다는 실험결과들도 보고(Feng, 1984)되어 있다. 이런 상황에서 엽록체 유전자의 모성유전에는 단순한 한가지 작용기작이 관여하는 것이 아니라 좀 더 복잡한 기작이 관여할 것이라고 생각된다.

한편 polyamine은 동물, 식물, 미생물 모두에 존재하고 있으며 이들의 성장과 분화에 필수적인 것으로 알려져 있다(Galston, 1983). 또한 polyamine은 nucleic acid와 interaction을 하며 특히 tRNA methylation을 촉진한다(Mach *et al.*, 1982). 이외에도 nucleosome core particle을 안정화시키고(Morgan *et al.*, 1987) translation의 fidelity를 증가시켜 주며(Naranda and Kucan, 1989) DNA replication을 촉진한다고 보고(Geiger and Morris, 1980)되었고, *in vitro*에서 endonuclease의 활성을 억제 또는 증가시키며 (Kuosmanen and Pösö, 1985; Pingoud *et al.*, 1984; Shishido, 1985)제한효소의 star activity를 억제한다는 보고(Pingoud, 1985)도 있다.

이러한 사실들에 기초하여 본 실험에서는 *Chlamydomonas*로부터 DNA methyltransferase를 분리하여 *in vitro*에서 polyamine이 이 효소에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

실험방법

실험재료 및 배양. EcoRI methylase는 Promega에서 구입하였고 *Chlamydomonas reinhardtii*는 strain 21gr(mt⁺)을 사용하였다. S-adenosyl-L-[Me-³H] methionine(specific activity 19Ci/mmol)은 ICN, substrate DNA는 calf thymus DNA type IV를 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

*Chlamydomonas*의 영양생장기, 배우체시기 배양은 R. Sager의 방법을 변형한 Snell의 방법(1982)을 이용하였다.

완충액. 완충액은 Sano(1980)의 방법을 변형하여 사용하였다. 완충액I은 50mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15M potassium chloride, 1mM 2-mercaptoethanol, 1mM EDTA와 5% glycerol로 조성하였다. 완충액II는 20mM potassium phosphate(pH 7.2), 20mM sodium chloride, 1mM 2-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 5% glycerol로 조성하였다. 이 완충액은 사용전에 121°C에서 15분간 고압멸균기로 멸균하여 사용 하였다.

DNA methyltransferase의 분리. DNA methyltransferase의 활성은 30분간 반응시 1pmol의 methyl기가 DNA에 incorporation되는 양을 1unit로 정하였다. *Chlamydomonas reinhardtii* 21gr(mt⁺)을 영양생장기 배지 5ℓ에서 6,000 lux의 빛을 조사하면서 4×10⁶ cells/ml이 될때까지 배양한 후 원심분리(1,300 x g, 3분)하여 모든 세포를 배우체유도 배지 500ml에 다시 재현

탁하여 16시간동안 2,000 lux의 빛을 조사시키면서 배양체를 유도하였다. 이 배양체 세포를 원심분리(1,300 x g, 3분)하여 세포를 모아 완충액 I에 현탁시켜 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄하였다. 이것을 원심분리(15,000×g, 30분)하여 cell debris를 가라앉혀 상등액만을 취하였다. (fraction I). 이 상등액을 초원심분리(75,000×g, 120분, 4°C)하여 다시 상등액만 취하였다 (fraction II). 이 fraction II에 Sepharose bound DNase(Cuatrecasas, 1970)를 처리하고 Mg-acetate가 10mM이 되게 하여 0°C에서 3시간 동안 천천히 교반시켰다. 원심분리(3,000×g, 3분, 4°C)로 Sepharose bound DNase를 제거한 후 ammonium sulfate분획을 하고(fraction III), 완충액 II에서 이것을 15시간 투석하였다. 미리 완충액 II에 평형된 DEAE-cellulose column (2.3×15cm)에 위 sample을 적용시켜 완충액II를 흘려준 후 NaCl linear gradient(0.02M-0.5M)로 용출시켜(Sano & Sager, 1980), 여기서 얻은 active fraction을 모아 YM-30 ultramembrane filter를 이용하였다(fraction IV). 위에 남아있는 용액을 완충액 II에서 10시간 투석한 후 완충액 II에 평형된 hydroxyapatite column에 적용시킨후 완충액 II로 용출시켰다. 이때 흘러나온 sample을 모아 효소원으로 사용하였다(fraction V).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Laemli의 방법(1970)을 따랐다.

DNA methyltransferase의 활성도 측정. 효소활성도 측정에 사용되는 반응용액은 50mM Tris-HCl(pH7.5), 6mM dithiothreitol, 10mM EDTA, 0.2μCi S-adenosyl-[³H]-methionine (specific activity 19Ci/mmol), 2μg Calf thymus DNA type IV로 하였으며 최종부피가 20μl가 되게 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난후 이 반응용액 전체를 DE 81 paper에 spotting하여 60°C incubator에서 20분간 건조시킨 후, 이 DE 81 paper를 과량의 0.2M ammonium bicarbonate용액으로 세척하고 ethanol로 두번, ethyl ether로 한번 세척한 후 건조시켜 이 paper를 cocktail용액(PPO 5g, POPOP 0.1g, Triton X-100 667ml, toluene 333ml) 5ml에 넣어 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

Polyamine effect. DNA methyltransferase 반응용액에 polyamine을 10μM-20mM까지 농도별로 처리하여 효소를 첨가시키고 37°C에서 1시간 반응시켜 polyamine이 DNA methyltransferase 활성에 미치는 영향을 농도별로 조사하였다.

Polyamine이 반응시간에 따라 DNA methyltransferase 활성에 미치는 영향은 일정농도의 polyamine을 반응용액에 처리한후 20, 40, 60, 80, 100분의 반응시간에 따른 효소활성을 조사하였다.

실험결과 및 고찰

DNA methyltransferase의 분리. 50ml의 완충액 I에 *Chlamydomonas reinhardtii* 21 gr(mt⁺) 배양체 25 g 을 현탁시킨후 세포를 파쇄하였다. 초원심분리를 하였을 때 crude supernatant에서보다 specific activity가 3배가량 증가하였다. Ammonium sulfate 분획시 30% 이하에서도 DNA methyltransferase는 약 40 units가 존재하며 specific activity는 0.9이었고 55%이상에서는 전혀 활성도가 나타나지 않았다. 그러나 대부분의 DNA methyltransferase가 30% - 55% 사이에 존재하여 구간을 30% - 55%로 정하였는데 이 구간에서 specific activity는 약 2배 증가하였다. DEAE cellulose chromatography시 완충액 II로 용출시킨 용출액에도 DNA methyltransferase가 존재하였으며 NaCl 0.02M-0.5M로 용출시켰을 때 약 0.1M NaCl농도에서 흘러나오는 용출

액에도 DNA methyltransferase가 존재하였다. 완충액 II로 용출액과 0.1M NaCl 용출액을 polyacrylamide gel electrophoresis로 확인한 결과 다른 종류임을 알아냈다. 그런데 이 두 종류의 활성도비는 1 : 0.83이었다. 여기서 0.1M NaCl농도에서 흘러나온 효소를 active fraction으로 하여 다음 단계로 진행시켰다. 이때 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis 결과 두종류의 major bands와 약 10종류의 minor bands가 존재하였다 (Fig. 2). 이것으로 hydroxyapatite chromatography를 수행한 결과 specific activity가 약 8.4배 증가하였다 (Table. 1). DEAE cellulose chromatography시에 나타난 두가지 methyltransferase의 비율대로 crude supernatant와 ultra supernatant, ammonium sulfate 분획시의 total activity를 계산하였다. DEAE cellulose chromatography를 통해서 얻은 DNA methyltransferase 활성이 있는 18-35번 fraction을 active fraction으로 하였다 (Fig. 1). Hydroxyapatite chromatography에서 완충액 II로 elution시킬 때 나온 용액을 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis로 확인해 본 결과 DNA methyltransferase가 major band로 존재하며 minor band로 2가지 단백질이 섞여 있었다 (Fig. 2). 이것은 DEAE-cellulose chromatography시 각 fraction을 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis한 것과 각 fraction의 효소 활성도를 측정된 것을 비교함으로써 major band가 DNA methyltransferase임을 알 수 있었다. 이때의 specific activity는 65units/mg protein이고 순화정도는 282.61이며 69.1%의 높은 수율을 보였다. Sano(1980)의 결과에 의하면 specific activity는 62units/mg protein, 순화정도는 310이고 41%의 수율을 보였다. 그러나 Sano(1980)의 실험은 첫 단계 DEAE-cellulose chromatography의 경우만 재현되며, 그 다음 단계인 phosphocellulose chromatography의 경우는 재현되지 않는다. 첫 단계 (DEAE-cellulose fraction)의 specific activity는 4.2units/mg protein이었다. 한편, 이 용액을 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂를 포함하는 용액과 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl을 포함하는 용액에 각각

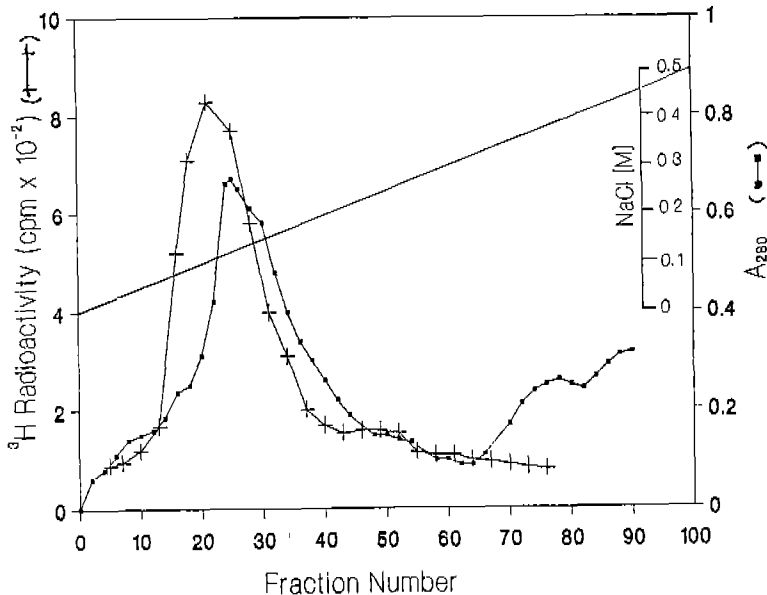


Fig. 1. Elution pattern of DNA methyltransferase from DEAE-cellulose chromatography

λ DNA 400ng과 함께 섞어 넣어주어 최종부피가 20 μ l가 되게하여 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 반응시킨 후 0.7% agarose gel electrophoresis를 통해 확인해본 결과 nuclease가 존재하지 않는것으로 사려된다(Fig. 3).

또한 Sephadex를 이용한 gel filtration을 시도하였으나 이때 효소활성이 급격히 감소하여 효소활성도 측정을 할 수가 없었다. 이효소를 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 약 60,000의 분자량에 해당하는 위치에 뚜렷한 band가 형성되었으며 몇가지 미세한 band가 나타났다. 이 미세한 band는 오염된 단백질의 band라고 생각되며 뚜렷한 band가 DNA methyltransferase의 band라고 생각되어 진다. 이것으로 이 효소는 60,000dalton의 분자량을 가지는 monomer이거나 60,000dalton의 분자량을 가지는 subunit들로 이루어진 polymer일 것이

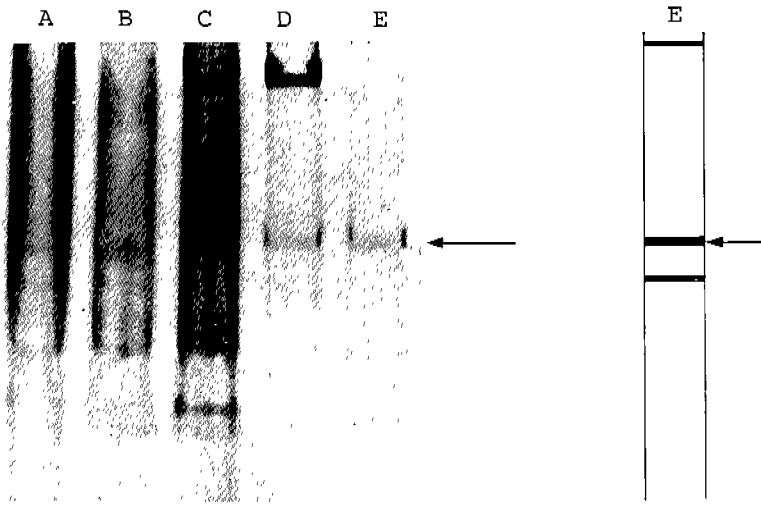


Fig. 2. DNA methyltransferase after non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis during purification. Gels containing 7.5% acrylamide were according to Laemli(1970) without SDS and stained with CBB.

- A ; Crude supernatant
- B ; Ultra supernatant
- C ; Ammonium sulfate fraction
- D ; DEAE-cellulose fraction
- E ; Hydroxyapatite fraction

Table 1. Purification of DNA methyltransferase from *Chlamydomonas*

	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific (units/mg protein)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude supernatant	1840	414	0.23	1	100
Ultra supernatant	532.9	380	0.71	3.08	91.8
Ammonium sulfate fraction	202.6	310	1.53	6.65	74.9
DEA E-cellulose fraction	442	344	7.78	33.83	83.1
Hydroxyapatite fraction	4.4	286	65	282.61	69.1

The protein concentration was estimated from Lowry's method(1951).

라고 생각할 수 있었다(Fig. 4). 앞으로 이 효소의 분리에 대하여 좀 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

Polyamine이 DNA methyltransferase 활성도에 미치는 영향. Putrescine, spermidine, spermine을 10 μ M부터 20 μ M까지 처리하여 *Chlamydomonas* DNA methyltransferase의 활성변화를 측정하였다(Fig. 5). Putrescine 처리시 20mM에서는 약 25%가 억제되었다. Spermidine의 경우 500 μ M까지는 거의 효과가 나타나지 않았으며, 10mM에서 약 32%, 20mM에서는 44%가 억제되었다. 반면 spermine을 처리한 경우 80 μ M까지는 전혀 영향이 없었으며, 10mM에서는 약 40%, 20mM에서는 약 53%가 억제되었다. 예비실험결과 중화시킨 polyamine을 사용했을 경우 pH에 의한 효소활성의 영향은 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 각각의 polyamine은 DNA methylation을 억제하며, putrescine보다는 spermidine, spermidine보다는 spermine이 DNA methylation을 더 효과적으로 억제하였는데 이러한 현상은 polyamine의 polycationic성질에 의한 것이라는 것을 짐작케 해준다. 이것이 *Chlamydomonas* DNA methyltransferase에 대해 나타나는 특이한 결과인지 아니면 다른 종류의 DNA methyltransferase에도 공통적으로 나

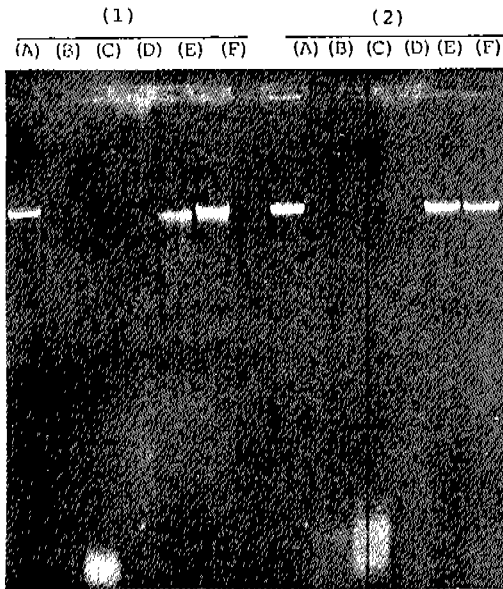


Fig. 3. The migration patterns of λ DNA after the each reaction on 0.7% agarose gel electrophoresis.

The reaction was run for 20 hours at 37°C.

(1) The reaction buffer consists of 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 10 mM MgCl₂. (2) The reaction buffer consists of 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 10 mM MgCl₂ and 50 mM NaCl.

(A): Control (B): Cude supernatant (C): Ultra supernatant (D): Ammonium sulfate fraction (E): DEAE-cellulose fraction (F): Hydroxyapatite fraction

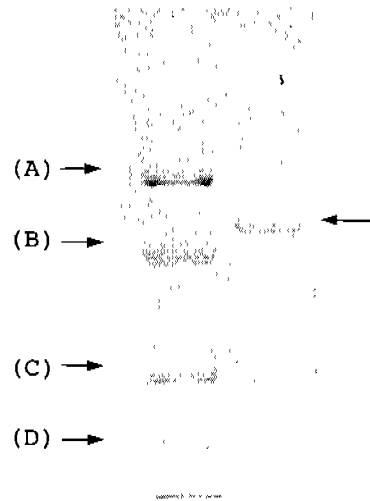


Fig. 4. The migration pattern of DNA methyltransferase from *Chlamydomonas* on 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.1% sodium dodecylsulfate.

(A): M.W. 67,000 BSA

(B): M.W. 43,000 Ovalbumin

(C): M.W. 30,000 Carbonic anhydrase

(D): M.W. 14,400 α -Lactalbumin

타나는 결과인지를 알아보기 위해서 EcoRI methylase의 활성화에 polyamine이 미치는 영향을 조사 하였다(Fig. 6). 이 경우 *Chlamydomonas* DNA methyltransferase보다 훨씬 더 낮은 농도에서 급격한 억제가 나타났다. 그리고 polyamine에 의한 methylation의 억제가 약50% 정도가 일어나는 것을 전후해서 포화 양상을 나타냈다가 polyamine농도가 더욱 증가하면 methylation이 급격히 100%억제되는 것을 볼 수 있었다(putrescine 제외). 또한 그림 5에서도 putrescine을 제외하고 spermidine, spermine의 경우 methylation이 50%억제를 전후해서 포화곡선을 그린다. 그러나 그림 5와 6에서 methylation의 억제는 polyamine동일 농도에 대해서 매우 상이하다. *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methyltransferase의 경우 20mM spermine에서 약 55%활성이, 감소하고 20mM spermidine에서 약 40%의 활성이 20mM putrescine에서 약 25%의 활성이 억제되었다. 그러나 EcoRI methylase활성의 경우 1mM spermine, 5mM spermidine, 10mM putrescine에서 효소활성이 거의 100% 억제되었다. 또한 EcoRI methylase 활성의 경우 polyamine에 의해서 (putrescine 제외) 두번의 급격한 감소가 나타나지만 *Chlamydomonase*에서 분리한 DNA methyltransferases는 한번의 급격한 감소만이 나타난다. 또한 EcoRI methylase의 경우 spermine에 의한 효소 활성 억제는 spermidine이나 putrescine보다 동일농도에서 매우 큰 것으로 나타나 있으나 *Chlamydomonas*에서 분리한 DNA methyltransferase에서는 spermine, spermidine에 의한 효소활성 억제는 별 커다란 차이가 없었다. 그림 6에서 나타나는 억제현상은 두 가지 현상의 복합체로 설명할 수 있다. 즉, 저농도에서는 polyamine이 DNA에 binding하여 EcoRI methylase가 DNA에 binding하는 것을 억제하여 효소활성을 억제하거나, 효소에 직접적인 영향을 미치는 것일수 있다. 그림 5에서의 결과는 바로 이 경우에 해당된다고 생각할 수 있다. 효소활성이 50% 억제되는 구간에서 polyamine농도가 일정정도 증가할 때까지 억제현상에 거의 변화가 없는 첫번째 포화곡선 이후의 효소활성이 약 500 μ M 정도의 spermine에서와 약 3mM 정도의 spermidine 농도에서 급격히 억제되는것은 DNA condensation에 의한 결과일 수 있다. 이것은 DNA 음전하의 90% 이상이 중화되어야 완전한 condensation이 급격히 일

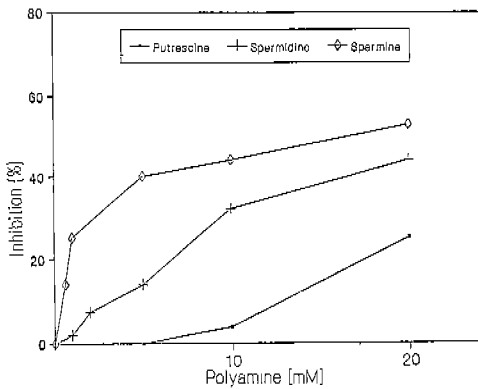


Fig. 5. Inhibition of *Chlamydomonas* DNA methyltransferase by polyamines. Varying amounts of the polyamines were added to the assay. The reaction was run for 60 minutes with 0.1 unit enzyme.

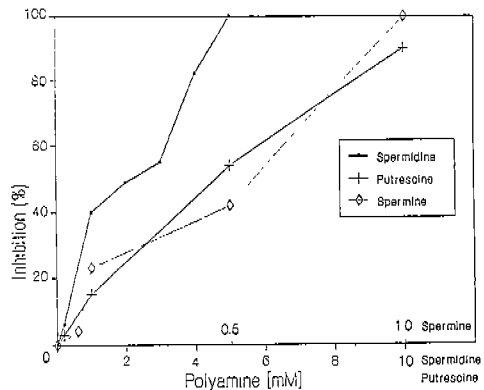


Fig. 6. Inhibition of EcoRI methylase by polyamines. Varying amounts of the polyamines were added to the assay. The reaction was run for 60 minutes with 2 unit enzyme.

어 난다는 보고(Tabor & Tabor, 1984)와 600 μ M spermine에서 거의 완벽한 condensation이 일어난다는 보고(Hwang, 1986)로 추론할 수 있다. 그림 5와 6에서 효소 활성 측정조건은 대부분이 동일하지만 효소원에 있는 NaCl이 *Chlamydomonas* methyltransferase에 훨씬 많이 존재하여 반응용액에 실제 4mM의 NaCl의 존재하며 EcoR1 methylase 반응용액에는 20 μ M의 NaCl이 존재하고 있다. 그런데 NaCl은 polyamine에 의한 condensation/aggregation을 억제한다(Pingoud, 1985). *Chlamydomonas*의 경우 NaCl에 의해 polyamine DNA condensation/aggregation이 억제되어 그림 5의 결과에서는 나타나지 않은 것으로 생각된다. 실제 쥐의 간세포에서 분리한 DNA methyltransferase의 활성화에 polyamine이 미치는 영향에 대한 실험(Ray, 1979)에서도 그림 6의 활성도 측정 반응용액내의 이온농도와 유사한 조건에서 비슷한 양상이 나타났다. 그러나 동일농도에서의 spermine, spermidine, putrescine에 의한 억제비율은 여기에서도 다르게 나타났다. 또한 이 보고에서 enzyme kinetics를 조사한 결과 methylation이 50%를 억제하는 polyamine 농도이하에서는 competitive inhibition양상을 나타내나 그 이상의 polyamine 농도에서는 해석하기 어려운 inhibition 양상이 나타났다. 그러면 polyamine이 효소자체에 영향을 주어 억제현상을 나타내는지 아니면 DNA에 영향을 주어 억제현상을 나타내는지 알아보기 위해 polyamine을 처리하여 반응시간에 따른 효소의 활성도를 측정하였다(Fig. 7,8). Spermine과 spermidine을 각각 1mM · 10mM · 20mM 처리한 후 반응시간에 따른 효소활성도는 모두 약 20분이 지난 후 평형상태에 이르렀으며 60분이 지난 후부터는 methyl기가 DNA로 전혀 incorporation되지 않았다. Polyamine이 이 효소에 직접 작용한다면 polyamine을 처리하지 않은 대조구에서 methyl기의 incorporation이 평형상태가 되었다하더라도 polyamine을 처리한 처리구에서는 계속 methyl기의 incorporation이 증가하여 반응시간이 길어짐에 따라 거의 대조구와 비슷한 값을 나타내야 하나 이 결과는 거의 동일한 반응시간에서 평형상태를 나타냈다. 이것은 polyamine이 효소에 직접 작용하는 것이 아니라 DNA에 작용하기때문인 것으로 추정된다. 즉, polyamine이 polycationic 성질에 의해서 DNA에 binding하여 (DNA의 condensa-

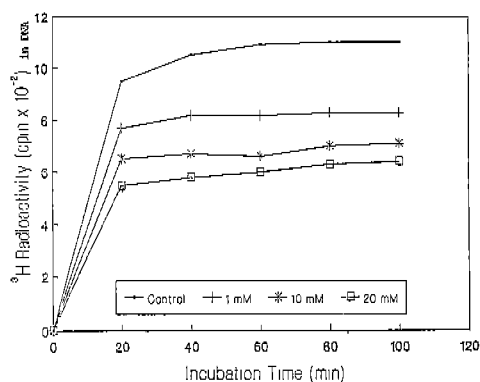


Fig. 7. Time curve of inhibition of DNA methylation by spermine. The reaction was run at varying times with 0.1 unit *Chlamydomonas* DNA methyltransferase and varying amounts of spermine.

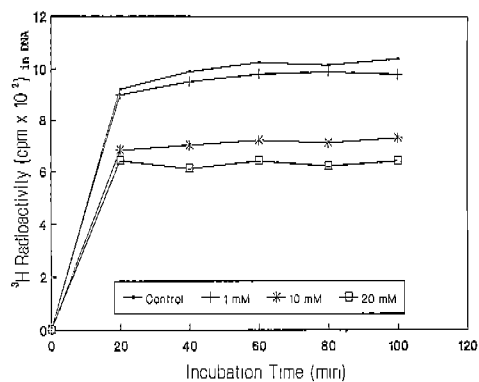


Fig. 8. Time curve of inhibition of DNA methylation by spermidine. The reaction was run at varying times with 0.1 unit *Chlamydomonas* DNA methyltransferase and varying amounts of spermidine.

tion/aggregation은 일으키지 않을 정도) DNA methyltransferase가 DNA에 binding하지 못하게 하여 즉, 이용 가능한 기질의 농도를 떨어뜨림으로써 이 효소의 활성도를 떨어뜨려 평형상태에 도달하는 시간이 대조구와 거의 동일하며 polyamine을 처리한 처리구에서 반응시간이 길어져도 methyl기의 incorporation이 증가하지 않는 것으로 추정된다. 생체내에서는 DNA에 binding된 polyamine은 histone acetyltransferase에 의해 acetylation되어 떨어졌다가 deacetylation된 후에 다시 DNA에 binding한다는 사실이 보고(Morgan, 1987)되었는데, 본 실험의 반응 조건에서는 histone acetyltransferase가 존재하지 않으므로 한번 binding된 polyamine은 다시 떨어지지 않을 것이다. 이상의 실험결과에서 나타난 polyamine에 의한 DNA methylation의 억제효과는 생체내에서 DNA의 hypermethylation이 일어날 경우 기질인 S-adenosyl methionine(SAM)이 polyamine합성에 쓰이고 다시 이 polyamine이 methylation을 억제함으로써 DNA의 hypermethylation을 막아준다(Ray, 1979)는 설명이 가능하나 이것은 좀 더 많은 *in vivo* 실험을 통해 확인되어야 한다.

Polyamine이 DNA methylation을 억제하는 기작으로는 몇가지 가능성이 있다 첫째, SAM에서 유도되는 polyamine의 propylamine group은 DNA methylase의 기질이므로 이 group이 methylase의 active site에 결합하고 나머지 amine group의 양전하가 DNA의 음전하에 결합함으로써 억제현상을 나타낼 가능성이 있다(Ray, 1979). 둘째, polyamine이 DNA에 결합하여 DNA의 음전하를 줄여서 DNA methylase가 DNA에 전하에 의한 결합을 하지 못하게 함으로써 methylation을 억제할 가능성이 있다. 셋째, polyamine이 DNA condensation/aggregation을 일으킴으로써 DNA methylase DNA와 관련된 대부분의 효소활성을 억제할 수도 있다(Pingoud, 1984). 넷째, polyamine이 DNA condensation/aggregation을 일으키지 않는다 하더라도 DNA의 구조를 변화시킴으로써 DNA구조를 인지하여 작용하는 효소의 활성을 억제할 수 있다 (Basu and Laurence, 1987; Chen *et al.*, 1984). 다섯째, 위의 가능성이 모두 합쳐져서 하나의 양상으로 나타날 수 있다. 이럴 경우 polyamine이 저농도에서는 효소에 따라 특이한 현상을 나타낼 수 있으나 고농도에서는 DNA condensation/aggregation을 일으켜 DNA와 관련된 대부분의 효소의 활성을 억제할 것이다. 그러나 polyamine이 DNA methyltransferase의 활성을 억제하는 작용기작은 훨씬 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

Polyamine이 *Chlamydomonas* DNA methyltransferase에 미치는 영향을 조사하기 위해서 *Chlamydomonas reinhardtii* 21 gr(m^+) 배우체에서 DNA methyltransferase를 282.6배로 분리하였다. 이때 polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 DNA methyltransferase인 뚜렷한 band 하나와 미세한 band 두개가 남아 있었다. 이것을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 하여본 결과 분자량 60,000dalton에 해당되는 곳에 뚜렷한 band가 형성되었다.

이 DNA methyltransferase의 활성도는 spermidine보다는 spermine에 의하여 더 효과적으로 억제되며, putrescine에 의하여 가장 적게 억제되었다. DNA methyltransferase 활성도는 5mM spermine 에서는 약 40%, 20mM에서는 53%가 억제되었으며 spermidine의 경우는 10mM에서 35%, 20mM에서는 44%정도가 억제되었다. 그러나 putrescine에 의해서는 5mM에서부터 억제되었고 20mM에서는 25%정도 활성도가 억제되었다.

REFERENCES

- Basu, H.S. and J.M. Laurence. 1987. The interaction of spermine and pentamine with DNA. *Biochem. J.* **244** : 243-246.
- Chen, H.H., J.B. Michael and C.R. Donald. 1984. Critical amount of oligovalent ion binding required for the B-Z transition of poly(dG-m⁵dC). *Nucleic Acids Research* **12** : 2381-2389.
- Cuatrecasas, P. 1970. Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **245** : 3059-3065.
- Feng, T.Y. 1984. The persistence of maternal inheritance in *Chlamydomonas* despite hypomethylation of chloroplast DNA induced by inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81** : 3438-3442.
- Galston A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* **33** : 382-388.
- Geiger, L.E. and D.R. Morris. 1980. Stimulation of deoxyribonucleic acid replication fork movement by spermidine analogs in polyamine-deficient *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141** : 1192-1198.
- Gillham, N.W. 1974. Genetic analysis of the chloroplast and mitochondria genomes. *Ann. Rev. Gen.* **8** : 347-391.
- Hhwang, S.B. 1986. A study on the restriction endonuclease inhibiting substance extracted from spinach and *Chlamydomonas*. M. Sc. Thesis, Yonsei University.
- Kuosmanen, M. and H. Pösö. 1985. Inhibition of the activity of restriction endonucleases by spermidine and spermine. *FEBS* **179** : 17-20.
- Kuroiwa, T. 1985. Mechanisms of maternal inheritance of chloroplast DNA: an active digestion hypothesis. *Microbiological science* **2** : 267-270.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.
- 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.
- Mach, M., H. Kersten and W. Kersten. 1982. Regulation of tRNA methyltransferase activities by spermidine and putrescine. *Biochem. J.* **202** : 153-162.
- Morgan, J.E., J.W. Blankenship and H.R. Matthews. 1987. Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles. *Biochemistry* **26** : 3643-3649.
- Naranda, T. and K. Zeljko. 1989. Effect of spermine on the efficiency and fidelity of the codon specific binding of tRNA to the ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **182** : 291-297.
- Pingoud, A. 1985. Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* **147** : 105-109.
- Pingoud, A., Caus Urbanke, J. Alves, H.J. Ehbrecht, M. Zabeau and C. Gualerzi. 1984. Effect of polyamine and basic proteins on cleavage of DNA by restriction endonucleases. *Biochemistry* **23** : 5697-5703.
- Ray, C. 1979. Polyamines inhibit DNA methylation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **86** : 594-598.
- Sano, H. and R. Sager. 1980. Deoxyribonucleic acid methyltransferase in the eukaryote *Chlamydomonas reinhardi*. *Eur. J. Biochem.* **105** : 471-480.
- Sager, R. 1954. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **40** : 356-363.
- Sager, R. and Z. Ramanis. 1973. The mechanism of maternal inheritance in *Chlamydomonas*: biological and

- genetic studies. *Theoretical and Applied Genetics* **43** : 101-108.
- Shishido, K. 1985. Effect of spermine on cleavage of plasmid DNA by nuclease S and BA131. *Biochimica et Biophys. Acta.* **826** : 147-150.
- Snell, W.J. 1982. Study of the release of cell wall degrading enzyme 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.
- William, G.B., C.T. Grabowy, and R. Sager. 1979. Role of methylation in the modification and restriction of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76** : 1390-1394.

(1989.10.1 接受)