

Deinococcus radiodurans RecA 단백질의 외가닥 DNA-의존성 ATPase 활성 분석

김 종 일

서울여자대학교 자연과학대학 식품과학부

Deinococcus radiodurans recA는 이 미생물의 방사선 저항성을 나타내는 표현형에 필수적이며 재조합성 DNA 수선 과정에 관여한다. 이 과정에서 RecA 단백질은 DNA와 결합하여 반응의 활성 중인 RecA nucleoprotein 필라멘트를 형성한다. DNA-의존성 ATPase 활성과 함께, RecA 단백질의 외가닥 DNA 혹은 이중가닥 DNA와의 상호작용은 RecA 단백질이 관여하는 반응의 중심과정으로 이에 관한 분석을 시도하였다. *D. radiodurans* RecA 단백질은 DNA에 결합한 DNA-단백질 복합체만이 ATPase 활성을 나타내므로, ATP (혹은 dATP) 가수분해를 측정함으로써 RecA와 외가닥 DNA와의 상호작용 정도를 분석하였다. *D. radiodurans* RecA 단백질은 외가닥 DNA의 염기 구성의 이질성에 영향을 받았으며, homopolymer인 poly(dT)와의 상호작용에서 가장 높은 가수분해 활성을 보였다. Homopolymer인 합성 DNA-의존성 ATP 및 dATP의 가수분해는 pH 6.0과 9.0의 범위에서 다소 일정한 속도로 일어났으며 최적 pH는 7.0과 7.5 사이였다. 외가닥 DNA-의존성 ATPase 활성은 염의 존재에 영향을 받아 KCl이 존재하면 다소 억제되나, K-glutamate가 존재하면 오히려 촉진되었다. RecA 단백질과 외가닥 DNA의 상호작용을 ATP 가수분해로 분석하였을 때 2 mM 이상의 magnesium 이온이 DNA 결합반응에 필요하였으며, 비교적 넓은 범위의 pH에서 외가닥 DNA와의 결합반응이 일어나며, 이러한 결합반응은 당량적인 비(1:3, RecA protein: DNA nucleotide)로 일어났다.

Key words □ ATP hydrolysis, *Deinococcus radiodurans*, DNA-dependent ATPase, RecA protein

*Deinococcus radiodurans*는 polyextremophile이며, 여러 형태의 심각한 DNA 손상을 효과적으로 수선하며, 특히 이온성 방사선에 대한 저항성은 이 미생물의 대표적인 독특한 표현형이다. *D. radiodurans*는 1.5 mega-rad의 gamma 방사선에 노출되어도 치명적인 손상 혹은 돌연변이 유발 없이 생존할 수 있으며, 저 선량(6,000 rad)의 지속적인 방사선이 존재하는 조건에서도 왕성하게 성장할 수 있다(10). 이러한 강한 저항을 나타내는 표현형은 효과적인 DNA 수선 과정에서 유래되는 것으로 추론 되지만 DNA 수선과정의 기작 이해는 아주 초보 단계이다. DNA 손상에 대한 매우 강한 저항성은 유전체 분석에 의해 나타난 여러 특징들 및 유전체의 서열분석으로는 나타나지 않는 DNA와 단백질의 구조적인 특이성 등의 통합적인 것으로 결정되는 매우 복잡한 것으로 나타난다. 특이적으로 *D. radiodurans*에 있어서 유전체 해석(annotation)에 의해 확인된 DNA 수선에 관련된 효소의 수는 *E. coli*에서 보고된 것에 비해 적은 것으로 나타났으며, 주 수선효소의 예상되는 발현양은 *E. coli*와 *D. radiodurans*에 있어 높은 양으로 발현되지 않는 것으로 보고되었다. 예외적으로 RecA 단백질은 높은 양으로 발현되는 것으로 예측되어(5) DNA 재조합 수선에 관련된 단백질들이 관심의 집중이 되고 있다. RecA 혹은

RecA-like 단백질은 고세균, 진정세균, 효모, 식물 및 포유동물 등 모든 계통수에서 발견되며, 상동 DNA 접합(pairing)과 상동재조합(homologous recombination) 과정에 있어 매우 중요한 역할을 수행한다. *D. radiodurans*에서도 예외는 아니며 *D. radiodurans*의 recA 유전자는 *Thermus* 종의 recA와 유사하며, *D. radiodurans*의 RecA 단백질은 *Thermus aquaticus* RecA와 69% 아미노산 서열 유사성을 가지며, *E. coli* RecA와 비교하면 53%의 아미노산 서열 유사성을 나타낸다. *D. radiodurans*의 recA를 파괴하게 되면 급격한 DNA 손상으로부터 회복되는 능력이 상실되며, 적은 양의 오래 계속되는 방사능이 존재하는 조건에서 성장하는 능력이 상실된다(11). RecA 단백질은 DNA-의존성 ATPase 활성을 가지며, 상동재조합 과정 및 DNA 재조합 수선과정에서 DNA 가닥(strand) 교환반응을 촉매한다. DNA 가닥 교환반응에서 RecA 단백질은 외가닥 DNA에 결합하여 RecA nucleoprotein 필라멘트를 형성하고 선형 DNA가 접합(pairing)하게 되어 연결분자(joint molecule)가 형성되면서 분지 이동(branch migration)이 진행되어 DNA 교환반응이 일어난다. 이 때 RecA nucleoprotein 필라멘트 전체에서 ATP 가수분해가 일어나 분지 이동반응을 효과적으로 일어나게 한다. ATP 가수분해가 공급되지 않은 조건에서는 구조적인 방해물이 기질 DNA에 존재하는 반응을 촉매 할 수 없으며, 분지 이동의 진행방향이 한쪽방향으로 진행하지 않게 되어 효율적인 반응이 일어나지 않게 된다. RecA 단백질의 ATPase 활성은 반응계에서 motor 기능을 하는

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-970-5638, Fax: 82-2-970-5977
E-mail: jikim@swu.ac.kr

중요한 기능을 담당한다(1). 외가닥 DNA는 RecA 단백질 필라멘트가 형성될 때 nucleation 부위가 되어 DNA에의 결합을 촉진하게 되며, DNA 가닥 교환반응의 시작부위이다. 생체 내에서 외가닥 DNA는 재조합 현상을 매우 유발하게 되며, DNA 수선 유전자들의 SOS 유발을 일으키는 신호로 작용하게 된다(3). 기능적인 RecA 단백질이 *D. radiodurans*의 극단적인 저항성의 발현에 중심적인 기능을 하는 것으로 판단되므로, 본 연구에서는 *D. radiodurans*의 RecA 단백질의 분자적인 기능을 확인하여 *D. radiodurans* RecA 단백질의 ATPase 활성에 대한 특성을 분석하여 *D. radiodurans*의 방사선 저항성을 특정화시키는 *D. radiodurans* RecA 단백질의 직접적인 역할 담당을 추론하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

각종 시약 및 ATP 재생 및 연결시스템(coupling system)을 이루는 Phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase, lactic dehydrogenase, NADH와 ATP는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, DEAE-Sepharose FF resin과 Bio-Gel hydroxyapatite는 BioRad (USA)에서 구입하여 사용하였으며, ϕ X174 환형 외가닥 DNA, 초나선 이중가닥 DNA (dsDNA)는 New England Biolabs에서 구입하였으며 DNA의 농도는 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 외가닥 DNA에 대해서는 36 mg/ml/A260, 이중가닥 DNA에 대해서는 50 mg/ml/A260을 전환계수로 사용하여 뉴클레오티드 농도로 표시하였다. poly(dA), poly(dT), poly(dG) 및 poly(dC) 등의 합성 DNA는 Amersham에서 구입하였으며 농도는 뉴클레오티드 농도로 표시하였다. *D. radiodurans* SSB 단백질은 위스콘신 대학교 생화학과 Cox교수로부터 얻어서 사용하였다.

RecA 단백질 정제

D. radiodurans native RecA 단백질은 이 유전자가 클로닝된 pEAW158를 가지는 *E. coli* STL2669/pT7pol26 균주를 앰피실린 (100 μ g/ml) 및 카나마이신(40 μ g/ml)이 함유된 LB broth에 접종한 후 37°C에서 600 rpm에서의 흡광도가 0.5되게 4-5시간, 200 rpm 진탕 배양하였다. IPTG (최종농도 0.4 mM)를 첨가하여 recA 유전자 발현을 유도하고 3시간 더 배양하여 미생물 세포를 수확하였다. 세포(50 g)를 25% sucrose가 포함된 250 mM Tris-HCl (80% cation, pH 7.5) 완충용액(200 ml)에 잘 녹이고, lysozyme (1.4 mg/ml)를 첨가하여 4°C에서 1시간 반응하였다. EDTA (10 mM 최종농도)를 첨가하고 30분간 저어주면서 반응을 한 후 초음파 파쇄하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 4°C에서 31,000 \times g로 1시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 조추출물로 이용하였다. 조추출물에 Polymin P (최종농도 0.5% v/v)를 천천히 첨가하고 4°C에서 30분간 저어준 후 25,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 침전물을 50 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT)으로 2번 세척하고 4°C에서 15분간 저어주면서 현탁

한 후 25,000 \times g로 20분간 원심 분리하여 상층액을 버리고, RecA 단백질을 용출하기 위해 최종 침전물을 200 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액으로 세척하면서 현탁하고 25,000 \times g로 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. Ammonium sulfate (0.2002 g/ml)를 첨가하고 원심 분리하여 침전된 단백질을 버리고 상층액에 또 다시 ammonium sulfate (0.145 g/ml)를 첨가한 후 25,000 \times g로 30분간 원심 분리하여 RecA 단백질을 침전시켰다. 침전물을 ammonium sulfate (0.377 g/ml)가 포함된 R 완충용액으로 세척하여 polymin P를 가능한 한 제거하고 200 mM ammonium sulfate가 포함된 R 완충용액에 잘 녹이고 투석 망에 넣어 4°C에서 50 mM KCl이 포함된 R 완충용액에 18시간 동안 완충용액을 3회 바꾸어 가며 투석하여 ammonium sulfate를 제거하였다.

투석한 ammonium sulfate 분획물에 대해 DEAE-Sepharose 크로마토그래피를 실시하였다. DEAE-Sepharose fast flow (2.5 \times 12 cm) resin을 충전하여 50 mM KCl이 포함된 R 완충용액으로 2 ml/min의 유속으로 column을 충분히 평형화시켰다. 단백질 분획물을 150 ml/h의 유속으로 장전한 후 동일 완충용액으로 결합되지 않는 단백질이 완전히 제거되도록 흘려주었다. 수지에 결합된 단백질을 0-500 mM NaCl 농도 구배를 걸어 2 ml/min의 유속으로 총 600 ml 흘리면서 분획들을 모아 다음 과정에 이용하였다.

D. radiodurans RecA 단백질이 포함된 분획들을 모아 350 mM P 완충용액(350 mM potassium phosphate; pH 7.5, 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 투석하고 동일한 완충용액에 평형된 Bio-Gel hydroxyapatite column (2.5 \times 15 cm)에 장전하였다. 300 ml의 P (500 mM phosphate) 완충용액으로 흘려주어 RecA 단백질을 용출하였다. 순수한 RecA 단백질이 포함된 분획들을 모아 저장완충용액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT)에 투석한 후 소량씩 나누어 -80°C에 보관하였다. *D. radiodurans* RecA 단백질의 농도측정은 흡광계수 0.372 A280 mg/ml을 이용하였다(6).

ATPase 활성분석

RecA 단백질에 의한 ATP 가수분해는 발표된 방법에 의해 분석되었다(6). 모든 반응은 37°C에서 수행되었으며, ATP 가수분해의 정도는 연결된 분광 흡도계적인 활성분석으로 측정되었다. ATP 가수분해로 생성된 ADP는 pyruvate kinase에 의해 ADP와 phosphoenolpyruvate는 pyruvate로 전환되며, 다시 lactate dehydrogenase에 의해 pyruvate와 NADH는 lactate를 생성하며, NADH는 NAD⁺로 전환된다. 이 전체 반응에서 생성된 ADP 양은 NADH의 소모양과 1:1 정량비적인 관계이므로 NADH의 양을 분석하는 원리로 수행되었다. NADH의 흡광도 측정은 항온수조순환장치가 연결된 큐벳장치가 부착된 Shimadzu 분광흡도계를 사용하였으며 반응혼합물은 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 mM potassium glutamate와 10 mM magnesium acetate를 포함하며 RecA 단백질, DNA와 ATP 혹은 뉴클레오티드의 농도는 각각의 조건에 표시하였다. pH가 변하는

조건에서는 완충용액의 농도는 25 mM로 하였다. ATP 재생 system은 3 mM phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase (10 U/ml), 및 3 mM potassium glutamate로 구성되었으며, coupling system은 2 mM NADH와 lactate dehydrogenase (10 U/ml)로 첨가되었다. Nucleotide cofactor로 dATP가 사용될 경우 dATP 재생 및 coupling system의 농도는 pyruvate kinase (25 U/ml), lactate dehydrogenase (60 U/ml)로 증가하여 사용하였다. ATP 가수분해 속도는 1분당 NADH의 감소량으로 측정하였으며, NADH의 정량은 NADH의 380 nm에서의 흡광도 계수 1,210 M/cm을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Deinococcus radiodurans RecA 단백질의 ATPase 활성 분석

외가닥 DNA-의존성 (d)ATPase 분석

Deinococcus radiodurans RecA 단백질의 DNA strand exchange 반응 조건에서 (d)ATP 가수분해는 전적으로 DNA에 의존적이고 (d)ATP 가수분해의 활성종(active species)은 RecA 필라멘트이므로 DNA-의존성 (d)ATP의 가수분해속도는 RecA 단백질의 DNA에의 친화도 및 RecA-DNA 복합물의 안정성과 연관되어 있으므로 높은 가수분해속도를 유발하는 DNA cofactor는 RecA 단백질과의 친화도가 높아 보다 더 강한 결합을 할 수 있다고 제안되었다(7). 서로 다른 길이의 ssDNA와 염기구성의 이질성 효과를 분석하기 위해 여러 가지의 DNA cofactor를 사용하여 ATP (or dATP) 가수분해반응을 측정하였다. poly(dA), poly(dT), poly(dG) 및 poly(dC) 등의 합성 DNA를 사용하여 ATPase (dATPase) 활성을 분석한 자료를 Fig. 1에 나타내었다. 모든 조건에서 Dr RecA 단백질은 dATP를 ATP보다 더 빨리 분해하였으며 모든 DNA cofactor와의 결합에서 pH 7.0-8.0에서 가장 최대의 반응이 일어났으며, poly(dT)와의 RecA 복합체가 가장 빨리 분해하였다. poly(dT)를 DNA cofactor로 사용하였을 때 dATP 가수분해의 최적 pH는 7.5와 8.0 사이였으며, ATP의 가수분해는 넓은 범위의 pH에서 일정하게 20 $\mu\text{M}/\text{min}$ 속도로 일어났다. poly(dC)를 DNA cofactor로 사용하였을 때 dATP 및 ATP의 가수분해는 pH 7.0에서 최대속도를 나타냈으며 pH가 증가하면 다소 완만한 감소현상을 보였다. poly(dA)에 결합한 Dr RecA 필라멘트는 10 $\mu\text{M}/\text{min}$ 속도로 ATP를 가수분해하며 중성 pH에서의 속도가 가장 크며 pH가 증가함에 따라 약간의 감소가 일어났다. 이러한 pH profile은 natural 외가닥 DNA (fX174의 환형 외가닥 DNA 혹은 M13mp8의 환형 외가닥 DNA)를 DNA cofactor로 사용하였을 때와는 완전히 다른 양상으로 나타났다(6). fX174 환형 외가닥 DNA를 사용하였을 때, dATP의 가수분해는 pH 6.0과 9.0의 범위에서 다소 일정한 속도로 일어났으며 최적 pH는 6.0과 7.5 사이였으며, 반면 ATP 가수분해는 pH 6.0에서 최대속도를 나타냈으며 pH가 증가할수록 감소하였으며, pH 8.0 이상에서는 급격한 감소현상을 보였다.

염기조성의 차이에 의한 효과는 피리미딘으로 구성된

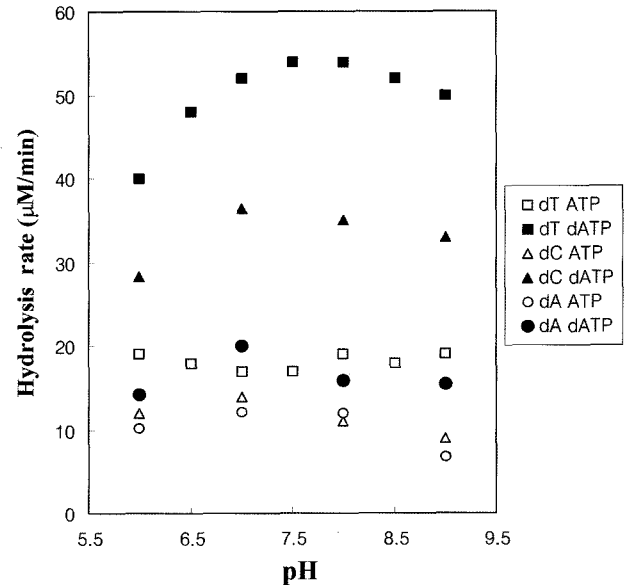


Fig. 1. Effect of homopolymeric DNA cofactor on the hydrolysis of (d)ATP by the Dr RecA protein at various pHs. Reactions were carried out as described in Materials and Methods, and reaction mixtures contained 5 mM ssDNA, 2.5 μM Dr RecA protein, and a 2 mM concentration of either ATP or dATP. Reaction with poly dT and ATP (□), reaction with poly dT and dATP (■), reaction with poly dC and ATP (△), reaction with poly dC and dATP (▲), reaction with poly dA and ATP (○), reaction with poly dA and dATP (●).

homopolymer가 퓨린으로 이루어진 homopolymer DNA cofactor보다 더 많이 (d)ATPase활성을 촉진하였다. 이것은 Dr RecA 단백질이 중성 pH에서 poly(dT)>poly(dC)>poly(dA)의 순으로 친화도가 높게 결합한다는 것을 간접적으로 제안하는 것이다. 이 현상은 *E. coli* RecA 단백질의 외가닥 DNA의 친화도가 poly(dT), natural DNA인 M13mp8 DNA, poly(dC), poly(dA)의 순으로 결합하는 경향과 유사한 것으로 박테리아 RecA 단백질의 전반적인 일반성과 일치한다. 여러 길이의 DNA oligo-nucleotide를 합성하여 (d)ATPase 활성을 촉진하는 최소 길이의 DNA cofactor를 조사하였다. (dT)3, (dT)6, (dT)12, (dT)30, 및 (dT)60를 합성하여 이것을 DNA cofactor로 Dr RecA 단백질의 DNA-의존성 ATPase 활성을 측정하였다. 위에서 사용한 Poly (dT)는 평균길이가 600 뉴클레오티드로 측정되었다. 중성 pH 혹은 pH 8.0 이상에서는 (dT)60를 제외하고는 ATP 가수분해가 2시간 동안의 반응에서는 측정되지 않았고, pH 6.5에서 (dT)60-dependent ATP 가수분해속도는 12 $\mu\text{M}/\text{min}$ 으로 측정되었다(결과 미제시). DNA cofactor로의 (dT)30의 경우 pH 6.0에서의 ATP 가수분해가 0.6 mM/min정도로 겨우 측정 가능하게 나타났다. 약산성인 조건에서 60 nucleotides 보다 짧은 oligonucleotide들은 Dr RecA protein의 DNA-의존성 ATPase의 활성을 유발하는데 poor cofactor로 작용하는 것으로 판단된다.

DNA-의존성 ATPase 활성에 미치는 염(salt)의 영향

*D. radiodurans*는 이온성 방사선, UV 조사 및 산화제에 의한 DNA 손상에 매우 강한 저항성을 나타낼 뿐 아니라 건조현상(dessication)에도 현저한 저항성을 보여 매우 건조한 환경에서도 생존할 수 있다(12). 이러한 특성은 미생물 세포내의 탈수상태에서도 시스템이 잘 작동하게 조절되는 것을 의미하므로 여러 종류의 염(salt)조건에서의 Dr RecA 단백질의 외가닥 DNA-의존성 활성을 분석하였다. 특정 염기서열의 DNA에 결합하는 단백질은, DNA와 단백질의 상호작용의 현상에서 비공유 결합성 상호작용이 DNA 결합에의 염기서열 특이성과 안정성을 결정하므로 수소 결합, 이온결합, 소수성 상호작용 등이 중요하게 작용하나, Dr RecA 단백질처럼 염기서열에 비특이적으로 결합하는 단백질은 이온결합이 중요하게 작용하게 된다. RecA 단백질은 DNA의 sugar-phosphate backbone에 이온결합으로 상호작용하므로 시스템의 염 환경은 RecA 단백질의 활성에 큰 영향을 미친다. 표준 반응조건(25 mM Tris acetate; pH 7.5, 2 mM ATP, 5 mM DNA, 2.5 mM Dr RecA 단백질)에서 poly(dT)-의존성 ATP 가수분해속도는 19 $\mu\text{M}/\text{min}$ 로 측정되었고 0.1 M K-glutamate의 염이 첨가된 조건에서는 23.3 $\mu\text{M}/\text{min}$ 로 24% 증가하였으며 첨가되는 K-glutamate의 농도가 증가함에 따라 ATP 가수분해속도도 증가하였다. 0.2 M의 농도가 첨가된 조건에서도 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해속도가 같은 경향으로 증가하였다(Fig. 2). 대부분의 DNA 결합 단백질과 마찬가지로 Dr RecA 단백질에 의한 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해반응도 이온 환경에 영향을 받았으며 0.2 M KCl이 첨가되면 20%의 억제현상이 나타났다. 첨가되는 KCl의 농도가 증가하면 더 많은 정도의 억제가 일어났으며, 0.4 M KCl이 존재하면 ATP 가수분해활성이 50% 감소되었다. 0.2 M NaCl이 첨가된 환경에서는 억제현상이 보다 많이(40-50%) 일어났다(결과 미제시). 이러한 현상은 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해 활성이 양이온(cation) 농도에 대한

다른 민감성을 보여주는 것이다. K-acetate 역시 Dr RecA 단백질의 외가닥 DNA-dependent ATP 가수분해를 억제하는 효과를 보였다. 가수분해 활성이 0.3 M 농도까지 존재하여도 활성이 90% 이상 유지되었으나 0.4 M K-acetate가 존재하면 20%의 활성이 감소하였다. 일반적으로 K-acetate는 같은 농도의 KCl보다 훨씬 적은 정도의 억제 현상을 보였다. 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해 반응은 acetate 용액보다는 glutamate 용액에서 효과적으로 일어나는 것을 관찰하였다. K-glutamate는 0.3 M의 농도 까지는 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해 활성을 오히려 촉진하였다(Fig. 3). KCl 혹은 K-acetate가 존재할 때 RecA 단백질에 의한 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해는 염의 농도에 따라 더 많은 정도로 억제를 받으나, K-glutamate가 존재하면 이 같은 현상은 관찰되지 않는다. 이것은 반응 시스템에서 이온세기(ionic strength)가 직접적으로 DNA-의존성 ATP 가수분해반응에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. K-glutamate가 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해를 촉진시키며, ATPase 활성 그 자체에 영향을 주거나 혹은 Dr RecA 단백질의 외가닥 DNA binding을 안정화시키거나 촉진시키는 것으로 해석될 수 있다.

RecA protein과 외가닥 DNA와의 상호작용 분석

Gel mobility shift 분석

Dr RecA 단백질의 DNA-의존성 ATP 가수분해의 분석은, Dr RecA 단백질의 DNA 결합과 원래의 고유한 ATPase 활성의 복합적인 현상의 결과이므로 직접적인 DNA에의 결합 그 자체를 의미하는 것은 아니므로 RecA 단백질의 DNA에의 직접적인 결합을 분석하기 위해 Dr RecA 단백질과 외가닥 DNA를 혼합하여 그 결합체를 아가로스 젤로 전기 영동하여 자유 외가닥 DNA와 분리하였다. Dr RecA 단백질과 결합한 외가닥 DNA는

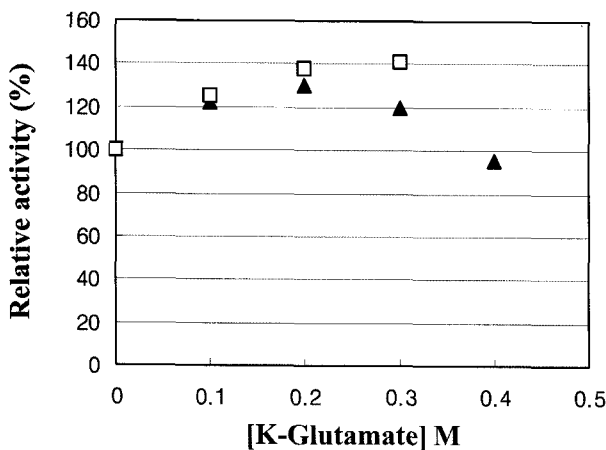


Fig. 2. Effect of K-glutamate on ssDNA-dependent ATP hydrolysis by Dr RecA protein. ATP hydrolysis reactions were performed at pH 7.5 in the presence of 2.5 μM RecA protein, 5 μM ssDNA, 2 mM ATP, and the indicated concentrations of K-glutamate poly (dT)-dependent reaction (\square) and ϕ X174 ssDNA-dependent reaction (\blacktriangle).

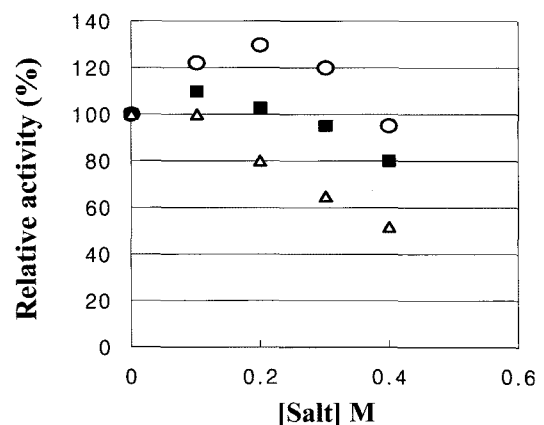


Fig. 3. Effect of salt on ssDNA-dependent ATP hydrolysis by Dr RecA protein. ATP hydrolysis reactions were performed at pH 7.5 in the presence of 2.5 μM RecA protein, 5 μM ϕ X174 ssDNA, 2 mM ATP, and the indicated concentrations of salt; K-glutamate (\circ), K-acetate (\blacksquare) and KCl (\triangle).

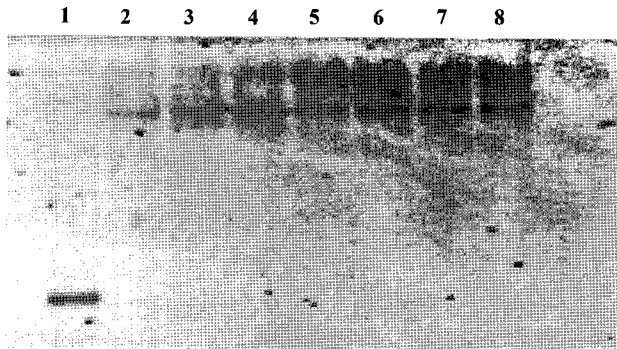


Fig. 4. Effect of pH on RecA protein binding to ϕ X174 ssDNA. Reaction mixture contained 25 mM buffer, 5 μ M ϕ X174 circular ssDNA, 2.5 μ M Dr RecA protein, 2 mM ATP and ATP regenerating system. Lane 1, free ssDNA; 2, pH 6.0; 3, pH 6.5; 4, pH 7.0; 5, pH 7.5; 6, pH 8.1; 7, pH 8.5; 8, pH 9.0.

전기영동 시 이동속도가 지연되어 자유 외가닥 DNA 보다 천천히 이동하게 되어 그 결합 여부를 분석할 수 있게 된다. ATP와 ATP 재생시스템이 함께 존재하는 반응조건에서 pH를 달리하여 Dr RecA 단백질과 외가닥 DNA와의 결합을 분석하였다(Fig. 4). Dr RecA 단백질은 pH 6.0에서 상대적으로 RecA 단백질-외가닥 DNA 복합체가 약간 적게 나타났으나, 넓은 범위의 pH(pH 6.0-9.0)에서 외가닥 DNA와 결합할 수 있는 것으로 나타났다. 외가닥 DNA-의존성 ATP 가수분해로 Dr RecA 단백질의 외가닥 DNA 결합을 분석하였을 때 pH 6.0에서 가장 높은 ATP 가수분해 속도가 나타났고 pH가 점점 증가함에 따라 ATP 가수분해가 점점 감소하는 양상을 보인 것은(6), 외가닥 DNA 결합 자체보다는 ATPase 활성 그 자체가 pH에 따른 영향을 받은 것으로 해석된다.

RecA 단백질과 etheno-외가닥 DNA와의 상호작용 분석

RecA 단백질이 관여하는 반응의 활성종은 nucleoprotein 필라멘트로 필라멘트의 안정도와 RecA 단백질의 DNA에 대한 친화도는 매우 중요한 역할을 한다. RecA 단백질의 DNA 결합을 정량적으로 분석하기 위해 etheno DNA를 제조하였다. Menetski and Kowalczykowski (9)의 방법으로 Φ X 174 (혹은 M13mp18) DNA를 20 mM Acetate 완충용액(pH 5.5)에서 chloroacetaldehyde와 반응시킨 다음 여분의 chloroacetaldehyde를 제거하기 위해 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)에 충분히 투석한 후 염기-변형된 etheno DNA를 ethanol을 가해 침전시켜 농축하였다. Etheno DNA는 excitation 파장 305 nm, emission 파장 410 nm에서 형광을 측정할 수 있다. RecA nucleoprotein 필라멘트에서 DNA는 원래 상태보다 길이가 긴 상태로 존재한다. RecA 단백질이 결합하면 DNA는 약 30% 길이가 늘어나게 되어, 단백질이 결합하지 않은 상태의 DNA와 길이가 늘어난 상태에서는 구별이 된다. RecA 단백질이 etheno DNA에 결합하면 etheno DNA는 길이가 늘어나게 되어 형광도가 증가되는 변화를 초래한다. 이것을 이용하여 *D. radiodurans* RecA 단백질의 DNA 결합 정도를 측정하

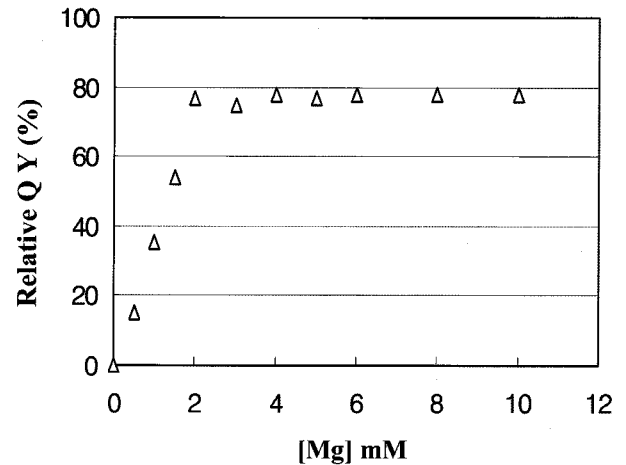


Fig. 5. Effect of Mg^{2+} concentration on Dr RecA binding to ssDNA. Reaction mixture contained 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 μ M potassium glutamate, 5 μ M ϕ X174 etheno-ssDNA, 2.5 mM Dr RecA protein, 2 mM ATP and ATP regenerating system and the indicated concentration of Mg^{2+} .

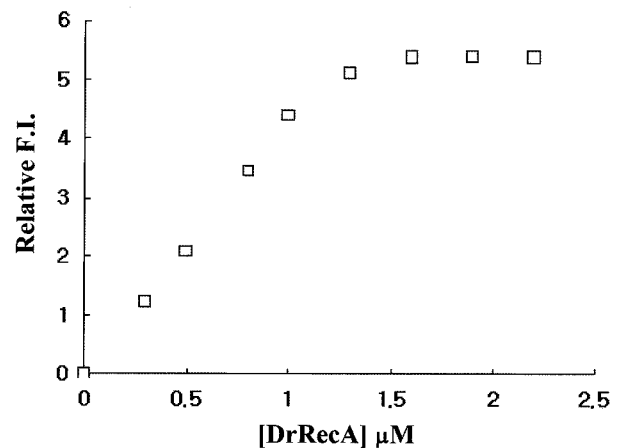


Fig. 6. Effect of Dr RecA protein concentration on the ssDNA binding. Reaction mixture contained 25 mM Tris-acetate (pH 7.5), 1 mM DTT, 5% glycerol, 3 mM potassium glutamate, 5 μ M ϕ X174 etheno-ssDNA, 10 mM magnesium acetate, 2 mM ATP and ATP regenerating system and the indicated concentration of Dr RecA protein.

여 RecA 단백질 시스템에 필요한 여러 가지 필수 요인에 대한 분석을 시도하였다. pH 7.5에서 Mg^{2+} 농도를 달리하여 Dr RecA 단백질(2 μ M)의 5 μ M etheno-외가닥 DNA와의 결합을 분석하였을 때 Mg^{2+} 이 없을 때에는 외가닥 DNA와의 결합에 의한 형광 증가현상이 관찰되지 않았고, 2 mM보다 낮은 농도에서는 Mg^{2+} 이 증가함에 따라 DNA 결합에 의한 형광도가 증가하였다(Fig. 5). 2 mM보다 높은 농도에서는 Mg^{2+} 이 증가함에 따라 더 이상 증가하지 않았고 포화현상을 보였다. 위의 실험에서 2 mM 이상의 Mg^{2+} 이 존재 할 때 ATP 혹은 dATP의 존재여부에 관계 없이 같은 결과를 관찰할 수 있었다. 이것은 Dr RecA 단백질의 etheno-외가닥 DNA와의 결합은 빨리 일어나며, ATP (혹은

dATP)를 필요로 하지 않는다는 것을 나타낸다. 하지만 Mg^{2+} 은 etheno-외가닥 DNA에의 결합에 필수적으로 필요한 것을 의미한다. pH 7.5, Mg^{2+} 농도 5 mM에서 Dr RecA 단백질 농도를 달리하여 etheno-외가닥 DNA (5 μM)에의 결합을 분석하였을 때 증가하는 Dr RecA 단백질을 첨가함에 따라 형광도도 증가하였고, 2 mM 이상에서는 더 이상의 증가현상이 없이 포화되었다 (Fig. 6). 이것은 더 많은 Dr RecA 단백질을 첨가하여도 일정양의 Dr RecA 단백질이 외가닥 DNA에 결합하고 여분의 Dr RecA 단백질은 DNA의 결합 부위가 이미 포화되어 DNA 결합할 수 없게 된다. Dr RecA 단백질의 etheno-외가닥 DNA에의 결합 자료에서 포화되는 농도보다 낮은 농도에서는 Dr RecA 단백질의 양에 비례하여 증가하므로 이 부위의 기울기와 포화되어 더 이상의 증가되지 않는 부위의 교차점(asymptote)에서의 Dr RecA 단백질의 농도가 1.7 μM 이므로 DNA 결합에서의 결합 부위 크기는 3 뉴클레오티드로 계산될 수 있다. 이것은 하나의 Dr RecA 단백질 단량체(monomer)가 외가닥 DNA에 결합할 때의 당량비(stoichiometry)가 3이라는 것을 의미한다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 서울여자대학교 자연과학연구소 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

참고문헌

1. Bedale, W.A. and M.M. Cox. 1996. Evidence for the coupling of ATP hydrolysis to the final (extension) phase of RecA protein-mediated DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* 271, 5725-5732.
2. Carroll, J.D., M.J. Daly, and K.W. Minton. 1996. Expression of RecA in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 178, 130-135.
3. Cox, M.M. 1999. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 63, 310-366.
4. Daly, M.J., L. Ouyang, P. Fuchs, and K.W. Minton. 1994. *In vivo* damage and RecA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 176, 3508-3517.
5. Karlin, S. and J. Mrazek. 2001. Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to ionizing radiation damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5240-5245.
6. Kim, J.I., A.K. Sharma, S.N. Abbott, E.A. Wood, D.W. Dwyer, A. Jambura, K.W. Minton, R.B. Inman, M.J. Daly, and M.M. Cox. 2002. RecA Protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: Expression, purification, and characterization. *J. Bacteriol.* 184, 1649-1660.
7. Lusetti, S.L. and M.M. Cox. 2002. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Ann. Rev. Biochem.* 71, 71-100.
8. Makarova, K.S., L. Aravind, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, K.W. Minton, E.V. Koonin, and M.J. Daly. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 44-79.
9. Menetski, J.P. and S.C. Kowalczykowski. 1985. Interaction of RecA protein with single-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* 181, 281-295.
10. Minton, K.W. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* 13, 9-15.
11. Minton, K.W. 1996. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat. Res.* 363, 1-7.
12. Richmond, R.C., R. Sridhar, and M.J. Daly. 1999. Physicochemical survival pattern for the radiophile *Deinococcus radiodurans*: a polyextremophile model for life on Mars. *SPIE* 3755, 210-222.
13. Venkateswaran, A., S.C. McFarlan, D. Ghosal, K.W. Minton, A. Vasilenko, K. Makarova, L.P. Wackett, and M.J. Daly. 2000. Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2620-2626.

(Received October 18, 2007/Accepted December 8, 2007)

ABSTRACT: Characterization of Single Stranded DNA-Dependent ATPase Activities of *Deinococcus radiodurans* RecA Protein

Jong-II Kim (Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea)

The RecA protein of *Deinococcus radiodurans* is essential for the extreme radiation resistance of this organism. The central steps involved in recombinational DNA repair require DNA-dependent ATP hydrolysis by recA protein. Key feature of RecA protein-mediated activities is the interactions with ssDNA and dsDNA. The ssDNA is the site where RecA protein filament formation nucleates and where initiation of DNA strand exchange takes place. The effect of sequence heterogeneity of ssDNA was examined in this experiment. The rate of homopolymeric synthetic ssDNA-dependent ATP hydrolysis was constant or nearly so over a broader range of pHs. For poly(dT)-dependent ATP or dATP hydrolysis, rates were generally faster, with a broader optimum between pH 7.0 and 8.0. Activities of RecA protein were affected by the ionic environment. The ATPase activity was shown to have different sensitivity to anionic species. The presence of glutamate seemed to stimulate the hydrolytic activity. Dr RecA protein was shown to require Mg^{2+} ion greater than 2 mM for binding to etheno ssDNA and the binding stoichiometry of 3 nucleotide for RecA protein monomer.