



원자력 기반 연구  
방사선에 의한 유전자 손상방어 기술연구

Protection of DNA Damage by Radiation Exposure

1998. 12.

한국원자력연구소

KAERI/RR-1858/98

원자력 기반 연구  
방사선에 의한 유전자 손상방어 기술연구

Protection of DNA Damage by Radiation Exposure

1998. 12.

한국원자력연구소

# 제 출 문

한국원자력연구소장 귀하

본 보고서를 “원자력기반연구” 과제의(단위과제:“방사선에 의한 유전자 손상방어  
기술연구”) 연차보고서로 제출합니다.

1998 년 12월 31일

연 구 팀 : 원자력환경연구팀

과제책임자 : 이 정 호

연 구 원 : 김 인 규

연 구 원 : 이 강 석

연 구 원 : 김 국 찬

Post Doc. : 오 태 정

# 요 약 문

## I. 제목 : 방사선에 의한 유전자 손상방어 기술연구

## II. 연구의 목적 및 중요성

점진적 증가추세에 있는 방사선 및 RI의 산업적, 의학적 이용에 따라 방사선 장애가 불가피하게 되었다. 이러한 방사선에 의해 나타나는 손상 또는 장애를 줄일 수 있는 기반기술을 확립하여 인적손실을 보전함에 연구의 목적을 두고 있다.

## III. 연구의 내용 및 범위

폴리아민 (Polyamine)은 기능이 알려져있지 않은 몇 개의 대사물질 중의 하나이며, 이들은 2개 이상의 아민기를 가지고 있는 다가 양이온 화합물을 총칭하는 말로서, 어떤 특정생물계에 편재하지 않고 동물, 식물 그리고 미생물을 포함한 살아있는 거의 모든 생명체에 mM 수준으로 존재하고 있다. Putrescine과 cadaverine 등은 linear form의 양쪽 말단에 아민기능기를 가지고 있으며, spermidine과 spermine은 internal position에 또 다른 아민기를 가지고 있어, 마그네슘 2가 이온과 함께 세포내의 대부분의 양전하를 담당하고 있다.

지난 30여년간의 폴리아민에 대한 연구가 진행되어오면서 생체내의 폴리아민의 합성경로, 관련효소의 동정 및 조절기작, transport system 등에 관한 연구가 수행되어졌고, 시험관 및 생체내의 실험에서 폴리아민이 DNA의 복제, 전사발현, 번역 그리고 막구조의 안정화 등 여러 가지 주요 대사계에 관여한다는 보고들이 있다. 그럼에도 불구하고, 폴리아민의 정확한 생물학적 기능에 대해서는 알려져 있지 않은 상태이다.

지금까지 보고된 폴리아민의 생물학적 기능중의 하나는 폴리아민이 방사선 및

radical 분자들로부터 유전자손상을 보호한다는 보고가 있다. 따라서, 본 연구에서는 폴리아민에 의한 자외선 및 유전자 독성물질인 mitomycin C에 대한 방호능력을 시험하고자 하였다. 또한 자외선에 의해서 발현이 유도되는 대장균의 대표적인 SOS 유전자인 *recA* 유전자를 이용하여 야생형 대장균 균주와 폴리아민 결핍 대장균 돌연변이 균주에 있어서의 자외선 및 mitomycin C에 대한 유전자 발현정도를 대장균 유전학에서 표준 기법으로 이용되는 베타갈락토시다제 효소 활성측정 ( $\beta$ -galactosidase assay)을 통하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

- 1) 배양조건에 따른 야생형 대장균균주와 폴리아민 결핍 대장균 돌연변이 균주에서의 자외선 및 mitomycin C에 대한 *recA* 유전자의 반응성을 비교시험하였다.
- 2) 폴리아민이 *recA* 유전자의 자외선 및 mitomycin C에 대한 발현에 미치는 영향을 규명하였다.

#### IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

##### 1) 연구결과

최소배지와 영양배지에서의 자외선과 mitomycin C에 의한 *recA* 유전자의 발현정도를 시험한 결과, 최소배지에서는 mitomycin C에 대해서는 야생형 균주에서가 더 높게 발현되었으며, 반면에 자외선에 대해서는 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서 더 높게 발현되었다. 이는 폴리아민이 결핍되면 자외선에 의한 유전자의 손상이 더 심각하게 일어날 수 있기 때문에 *recA* 유전자의 발현이 더 크게 일어나는 것으로 해석할 수 있다. 이러한 결과는 폴리아민이 생체내에서 방사선으로 부터 유전자손상을 보호한다는 타연구자들의 연구결과와 일치하는 결과라고 볼수 있다. 반면에 유전자 독성물질인 mitomycin C에 대해서는 자외선과는 다른 기작에 의해서 유전자 손상을 일으키기 때문에 정확한 원인을 설명할 수는 없다. 그러나, 한 가지 가능성을 제시하면, mitomycin C는 DNA 염기서열중의 구아닌 (Guanine) 잔기 사이에 삽입되어 DNA 복제를 방해함

으로써, 유전자 손상을 유발하기 때문에, 폴리아민의 알려진 기능중의 하나인 DNA 나선의 응축 및 수축이 폴리아민이 결핍된 돌연변이에서는 그 정도가 덜하기 때문에 상대적으로 mitomycin C에 의한 유전자 손상이 덜 일어난다고 생각할 수 있을 것이다.

한편 영양배지에서는 자외선 및 mitomycin C에 의한 *recA* 유전자의 반응이 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서 모두 높게 나타났다. 이는 폴리아민이 유전자 손상방어에 중요한 역할을 한다는 것을 제시해 주는 좋은 결과이다. 이러한 현상에 대한 정확한 설명과 규명을 위해서는 좀 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 판단된다.

최소배지에서 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에 폴리아민을 첨가하여 배양한 후에 자외선 및 mitomycin C를 처리하였을 경우의 *recA* 유전자의 발현을 시험한 결과, 폴리아민 합성이 정상적으로 이루어지는 야생형 균주와 거의 동일한 발현을 보였다. 이는 폴리아민이 대장균 내지는 고등생물에 이르기까지 유전자손상 방어를 위해 필요로 하는 유전자들의 발현에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 제시해 준다.

## 2) 활용성에 대한 건의

본 연구의 결과, *recA* 유전자와 폴리아민 대장균 돌연변이 균주를 이용하면, 자연방사선을 검출할 수 있는 좋은 생물학적 선량계로서 활용될 가능성이 높으며, 이 돌연변이 균주를 유전자 조작을 통하여 방사선에 좀 더 민감한 균주를 개발함으로써, 실제로 생체에 매우 미약한 정도의 영향을 미치는 방사선의 양을 측정할 수 있는 중요한 도구로 활용될 수 있으리라 기대된다. 이렇게 함으로써 아주 단시간 내에 또는 간단한 방법으로 방사선의 유출 정도를 확인할 수 있는 시스템의 개발도 가능해지리라 판단된다.

또한 폴리아민 자체에 의한 유전자 손상방어 기작 연구를 함으로써, 기존에 알려진 많은 방사선보호제의 구조개선 문제에 중요한 기여를 하리라 판단된다.

# SUMMARY

## 1. Project Title

Protection of DNA Damage by Radiation Exposure

## 2. Objective and Importance of the Project

Radiation risk is inevitable in that radiation and radioactive isotopes have been increasingly used in industrial medical fields. Thus the objective of this study lies in minimizing the human risks through the development of technology for lessening radiation damage or risk.

## 3. Scope and Content of the Project

Polyamines, polycationic compounds, present in all living organisms. Polyamines have been involved in various metabolic processes but their biological role is not unknown. Recently, many researches have been reported that polyamiens protected the genetic damage against radiation. In this study, protection capacity of polyamines to UV and genotoxic material mitomycin C is examined and to compare the gene expression level of the representative SOS gene *recA* gene against UV and mitomycin C using the wild type and polyamine-deficient mutant, we have carried out as following experiments.

- 1) Comparison of responsibility of *recA* gene against UV and mitomycin C in wild-type and polyamine-deficient mutant strain according to culture condition.
- 2) Determination of effects of polyamines on the expression of *recA* gene against

UV-irradiation and mitomycin C treatment.

#### 4. Result and Proposal for Application

As that result about the level of expression of *recA* gene to UV radiation and mitomycin C treatment under minimal medium and rich medium, we found that *recA* expression by mitomycin C-treatment is decreased in the polyamine-deficient mutant compared to wild type in minimal medium. These results implicated that the degree of DNA damage is highly increased due to polyamine-deficiency causing higher expression of *recA* gene. On the other hand, we are not able to explain the exact reason for the expression of *recA* to genotoxins mitomycin C because it induces the DNA damage by different mechanism with UV.

Meanwhile, in rich medium, *recA* expression by mitomycin V-treatment and UV radiation showed at elevated levels in the polyamine-deficient mutant than those of wild type. These results suggested that polyamines play an important role in protection of DNA damage. It is necessary to further study for the elucidation of these phenomena.

In minimal medium, after polyamine-deficient mutant grown on polyamine-supplemented conditions, we examine the *recA* expression against UV radiation and mitomycin C-treatment. As a result, the *recA* expression shows similar level in both mutant and wild type. These results proposed that polyamines play an important role in expression of the genes essential for the protection of gene damage from prokaryotic to eukaryotic cells.

As a result of this study, the usage of *recA* gene and polyamine-deficient *E. coli* mutant have a probability as advantageous biological indicator detecting for



environmental radiation and the development of more sensitive strain to radiation via genetic engineering. To do this, we expected that the development of system that detects the radiation by means of more simple method or within short time. Also, it is expected that these results be contributed to the research of protection mechanism of genetic damage by polyamine, itself.

# 목 차

제 1장 서 론 .....	10
제 1절 방사선에 의한 생체장해 .....	10
제 2절 polyamines .....	13
제 2장 본 론 .....	16
제 1절 연구내용 및 방법 .....	16
1. 사용균주 및 배양조건 .....	16
2. $\beta$ -galactosidase 효소 활성측정 .....	16
3. Mitomycin C 처리와 UV 조사에 의한 <i>recA'</i> :: <i>lacZ</i> 유전자의 발현 측정 .....	17
제 2절 연구결과 및 고찰 .....	18
1. Mitomycin C와 UV를 처리했을 경우, 야생형과 폴리아민 결핍 돌연변이 균주 에서의 <i>recA</i> 유전자의 발현 .....	18
2. <i>recA</i> 의 SOS 반응에 미치는 폴리아민의 효과 .....	18
제 3장 결론 및 건의사항 .....	20
참고문헌 .....	22

## 표목차

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this study .....	25
---	----

## 그림목차

Fig. 1. Induction of <i>recA</i> gene expression by MC-treatment (A) and UV-irradiation (B) on minimal medium .....	26
Fig. 2. Induction profiles of <i>recA</i> gene by MC-treatment (A) and UV-irradiation (B) on LB medium .....	27
Fig. 3. Effects of polyamines on the <i>recA</i> expression by MC .....	28
Fig. 4. Effects of polyamines on the <i>recA</i> gene expression by UV irradiation ..	29
Fig. 5. A schematic model of the polyamine effect on the <i>recA</i> response by MC-treatment and UV-irradiation .....	30

# 제 1장 서 론

## 제 1절. 방사선에 의한 생체장해

방사선 (radiation)은 우리 지구상에서 볼 수 있는 여러 가지 에너지의 한가지 형태이다. 자연방사선은 환경내에서 언제나 접할 수 있고 생물의 생활활동에 막대한 영향을 주고 있으며 생물의 진화 (evolution)에도 지대한 영향을 미쳤다. 이러한 생명체들이 이온화 방사선에 의하여 피폭되면 생명체의 구성물질중 70 ~ 80%를 차지하고 있는 물분자와의 상호작용에 의하여 다양하고 많은 양의 비정상적 유해산소 라디칼 (예:  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )을 형성한다. 이러한 유해산소 라디칼(radical)은 매우 반응성이 강하여 생명체에 대한 방사선의 간접영향 (indirect effect)을 나타내는데 기여하고 있다. 최근에는 이러한 방사선에 의한 간접영향이 직접영향 (direct effect)보다 더 중요하다고 판단되고 있다. 이온화 방사선에 반응은 그 반응수준에 따라 생태학적 수준 (ecological), 개체수준 (individual), 세포적 수준 (cellular), 분자적 수준 (molecular) 및 원자적 수준 (atomic level)으로 구분할 수 있다. 상기의 반응수준은 각기 독립적인 것이 아니라 서로 유기적인 관계를 포함하고 있다. 그러나 방사선의 최종적 영향은 분자 및 원자적 수준에서 일어나며 이것이 궁극적으로 세포 및 개체 수준에서 표현형으로 나타나게 되는 것이다. 이러한 원자 및 분자수준에서의 영향이란 방사선피폭에 의하여 생성된 유해산소 라디칼과 생체고분자 (biomacromolecule or biopolymer)와의 반응이다. 생체를 구성하고 있는 고분자물질로서는 핵산 (DNA:deoxyribonucleic acid), 단백질 (protein), 탄수화물 (carbohydrate), 지질 (lipid)등을 들 수 있다. 이러한 분자들은 대부분 고유의 3차원적인 복잡한 구조 (three dimensional structure)를 형성하고 있기 때문에 유해산소 라디칼에 의한 미세한 원자 및 화학적 변화를 측정하기가 어려울 때가 많다. 그러나 이러한 고분자 물질들은 각기 정량화 측정이 가능한 물리, 화학적 성질을 가지고 있으므로 생화학

적으로 구조상의 변화를 간접적으로 모니터링할 수 있다. 이러한 물질의 대표적인 것이 단백질과 핵산이다.

단백질은 생체의 구조 및 생체내에서 일어나고 있는 제반의 화학반응을 조절하는 촉매역활과 호르몬조절 (hormonal regulation)작용등 생리적으로 생명현상에 중요하다. 이러한 단백질은 아미노산의 펩타이드 (peptide)결합에 의하여 생체구조에 적합한 conformation을 가지고 있으며 대부분의 활성장소 (active site)에는 전자 (electron)를 주고 받음으로써 반응을 촉매하며 아미노산의 측쇄 (side chain)인 R group이 이온결합 (ionic bond), 수소결합 (hydrogen bond), 이황화 결합(disulfide linkage)등에 의하여 단백질의 3차구조를 안정화 시킨다. 그러나 방사선에 의하여 발생된 유해산소 라디칼은 이러한 부위와 쉽게 반응할 수 있으므로 단백질의 기능을 상실할 수 있으며 생체내의 최적반응을 나타내게 하는 3차구조를 파괴하므로써 단백질이 가지고 있는 생체기능을 상실하게 할 수 있다.

세포내에서 모든 생체 대사반응등의 생명현상이 일어나고 각 개체의 유전정보를 다음 세대에 정확하게 전달하기 위하여는 핵산에 손상이 가지 않도록 구조를 유지하는 것이 중요하며 핵산의 일부분이 손상되었다 할지라도 효과적으로 손상부분을 수리할 수 있어야 한다. 일반적으로 핵산은 염색체의 주요구성물질이며 염색체 이상 (chromosomal abberation)은 방사선에 의한 생물학적 영향을 예측할 수 있는 좋은 지표 (indicator)이다. 방사선 피폭에 의하여 생성된 유해산소 라디칼은 최종적 DNA의 염기 (base)와 반응하게 되는데 일반적으로 피리미딘 (pyrimidine: thymine, cytosine)계열이 퓨린 (purine:adenine, guanine)계열보다 감수성이 강하다. 방사선 피폭에 의한 대표적인 DNA손상은 single strand breakage와 double strand breakage이다. 그 이외에 염기손상 및 DNA-DNA linkage등이 있으나 빈도와 생물학적인 중요성이 덜하다. 한편 이러한 breakage현상은 전기영동을 실시하여 정량화할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 방사선을 비롯한 다른 환경요인의 영향을 정량적으로 점검할 수 있다.

본 연구는 이러한 유전자손상을 방어 및 복구할 가능성을 제시하고 있는 생체내 물질인 폴리아민을 대상으로 하였다

## 제 2절. Polyamines

폴리아민 (polyamines)은 2개 이상의 아민기를 가지고 있는 다가양이온 화합물 (polycationic compound)을 총칭하며, 세포생장 (cell growth and differentiation), 핵산의 합성 (synthesis of nucleic acid), 유전자발현 (gene expression) 그리고 번역 (translation) 등 다양한 생명현상 및 반응에 관여한다고 알려져 있다 (Gaugus, 1980; Tabor and Tabor, 1984; Tabor and Tabor, 1985). 이러한 폴리아민은 동식물, 미생물등 모든 종류의 생명체에 mM 정도의 수준으로 존재하고 있다.

폴리아민은 강한 양전하를 띠기 때문에 핵산과 높은 친화력을 가지고 있다 (Tabor and Tabor, 1984). 폴리아민과 핵산의 상호작용에 대해서는 많은 연구보고들이 있다. T4 phage 그리고 herpes virus에 폴리아민이 DNA와 결합하고 있으며 (Tabor and Tabor, 1984), *Xenopus*의 간세포 (liver cell)에서 putrescine이 RNA와 결합을 하고 있으며, 초파리의 침샘 세포에 있는 인이 spermidine과 결합하고 있다고 보고되어 있다 (Tabor and Tabor, 1985).

또한 폴리아민의 전하를 띠는 성질 때문에 폴리아민이 DNA와의 결합 그리고 핵산의 구조를 변화시키는데 관여한다고 알려져 왔으며 (Williams *et al.*, 1994), 폴리아민에 의한 DNA의 구조적변화는 DNA대사에 관여하는 효소들에 영향을 주며, 그리고 DNA 염기서열에 특이적으로 결합하는 단백질들의 결합능력을 변화시킬 수 있다는 연구보고도 있다 (Panagiotidis *et al.*, 1995). 시험관내의 실험에서 폴리아민에 의해 B-DNA에서 Z-DNA로의 형태전환이 일어나며 (McMahon and Erdmann, 1982) 또한 폴리아민이 고농도로 존재할 경우, chromatin의 응축이 일어난다고 알려져 있다.

Thermine, caldohexaamine, reis (3-aminopropyl) amine 또는 tetrakis (3-aminopropyl) ammonium 같은 비정상적인 폴리아민들이 DNA에 대한 여러 가지 제한효소의 활성에 저해효과를 나타낸다고 보고되었다 (Kirino *et al.*, 1990). 이러한 결과는 폴리아민이 DNA의 특정부위에 결합하여 제한효소의 작용을 방해한다고 설

명함으로써 폴리아민이 DNA의 특정 염기서열에 결합할 가능성을 제시하기도 하였다. 또한 효모에서 spermidine과 spermine이 killer double-stranded RNA plasmid의 복제에도 필요하다고 알려져 있으며 (Cohn et al., 1978), 폴리아민이 복제중인 plasmid DNA를 singlet oxygen에 의한 산화적 손상으로부터 보호할 수 있다는 것이 밝혀졌다 (Khan et al., 1992).

한편, 폴리아민이 결핍된 대장균 (*Escherichia coli*) 세포는 UV와 감마선에 대한 민감도가 증가한다고 알려져 있으며 (Oh and Kim, 1998), 폴리아민인 spermine과 spermidine은 X-선에 대한 손상을 회복하는데 어떤 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Snyder and Lachmann, 1989). 또한 폴리아민에 의한 DNA의 구조적인 변화는 포유동물에서 항생제 및 X-선에 의한 DNA의 파괴에 대한 저항성을 설명할 수 있다고 제안되었다 (Hung et al., 1983). 이러한 발견들은 폴리아민이 분자수준에서의 방사선에 의한 DNA 손상의 회복이나 대장균의 SOS 반응에 관여할 수 있다는 중요한 정보를 제공해 준다.

대장균에서 DNA의 손상 (damage) 또는 복제 (replication)가 방해되면 SOS 반응이라 불리는 일련의 생리적인 변화를 초래한다 (Witkin, 1976; Walker, 1984). SOS 반응은 일반적으로 DNA 손상에 의해서 유도되는 (DNA damage-inducible) 전자의 프로모터 (promoter)에 *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase)를 융합시킨 유전자를 가지고 있는 균주를 이용하여 쉽게 모니터링 할 수 있다 (Kenyon and Walker, 1980). SOS 반응은 일련의 순서적으로 일어나는데, DNA가 손상되면 손상된 DNA에 의해 활성화된 *recA* 단백질이 SOS 유전자들의 전사 (transcription)발현 억제물질인 *LexA* 단백질에 결합하여 이 단백질을 파괴시킴으로써 유도되는 것으로 알려지고 있다 (Heitman and Model, 1991).

본 연구의 목적은 폴리아민에 의한 유전자 손상 및 방어기작 (damage-repair mechanism)을 규명하고 대장균의 *recA* 유전자의 SOS 반응에 미치는 폴리아민의 역할을 규명하기 위하여, 대표적인 화학적 DNA 손상인자인 mitomycin C와 그리고



물리적인 손상인자인 UV-irradiation을 처리하였을 때, 야생형 균주 (wild-type strain)와 폴리아민 결핍 돌연변이균주 (polyamine-deficient strain)에서의 *recA* 유전자의 발현을  $\beta$ -galactosidase 효소활성을 측정함으로써 비교 분석하고자 하였다.

## 제 2장 본 론

### 제 1절 연구내용 및 방법

#### 1. 사용균주 및 배양조건

실험에 사용된 균주는 Table 1에 자세히 기술되었다. TJ12 균주 (MA255  $\Delta lac$ )는 KH1366 균주를 donor로 하여 MA255 균주와 Hfr-mating을 시킴으로써 제작되었다. TJ13 균주 (TJ12 *speA210::Tn10*) 균주는 CAG12168(*speA210::Tn10*) 균주에 P1 파아지를 배양하여, 이 파아지 용균액을 TJ12 균주에 형질도입 시킴으로써 제작하였다. *recA'::lacZ* operon fusion plasmid인 pRecALac1을 가지고 있는 ACV1003 균주(Vollmer *et al.*, 1997)는 미국의 Dupont사의 LaRossa 박사로부터 구하였다. ACV1003 균주로 부터 plasmid pRecALac1을 분리한 다음 이 plasmid를 TJ13 균주에 형질전환 시켜서 TJ17 균주를 제작하였다. 형질전환은 Sambrook 등의 방법으로 실시하였다(1992).

균주의 배양은 호기적 조건에서 37°C에서 배양하였다. 영양배지로는 LB 배지 (1% NaCl, 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, pH 6.8)를 사용하였으며, 최소배지로는 M9 배지 (Miller, 1972)를 사용하였다. 최소배지에 배양할 경우에는 탄소원으로 0.8% glucose를 첨가했으며, thiamine은 최종농도가 1  $\mu\text{g/ml}$  되게 첨가하였다. Agar 배지는 1.5% agar 배지를 사용하였다. 폴리아민은 putrescine과 spermidine을 사용하였으며, SOS 반응에 미치는 폴리아민의 영향을 시험하기 위하여 최종농도가 0.1 mM되게 배지에 첨가하였다.

#### 2. $\beta$ -galactosidase 효소활성의 측정

$\beta$ -galactosidase 효소활성측정은 Miller(1972)의 방법으로 하였다. 1 ml의 반응 용액에 chloroform과 0.1% SDS를 각각 10  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고, 여기에 세포배양액을 0.1

ml 첨가한 다음 vortex하여 세포를 파괴시켰다. 이 반응용액을 28°C water bath에 5분간 처리한 다음, 기질인 o-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(4 mg/ml)를 0.2 ml 첨가하여 반응을 시작시켰다. 효소활성의 계산은 Miller(1972)의 방법으로 하였다. Induction factor는 UV를 조사하거나 mitomycin C를 처리한 배양액의 효소활성을 처리하지 않은 배양액의 효소활성을 나누어 계산하였다. 모든 실험은 세 번 이상 반복하여 재현성이 있는지 확인하였다.

### 3. Mitomycin C 처리와 UV 조사에 의한 *recA'*::*lacZ* 유전자의 발현 측정

Mitomycin C 처리에 의한 *recA* 유전자의 발현을 측정하기 위하여 12 - 16시간 동안 배양한 대장균 균주를 새로운 배지, 10 ml에 100배로 희석하여 접종한 다음, 37°C에서 shaking incubation 시켰다. 세포가 600 nm에서의 optical density가 0.2 - 0.4 정도 되었을 때, 배양액에 mitomycin C를 최종농도가 1  $\mu$ g/ml되게 첨가하였다. 배양액을 30분마다 1 ml씩 취하여 효소활성을 측정하였다.

UV 조사실험을 위해서 12 - 16시간 동안 배양한 대장균 균주를 새로운 배지에 100배로 희석하여 접종한 다음, 37°C에서 shaking incubation 시켰다. 세포가 600 nm에서의 optical density가 0.2 - 0.4 정도 되었을 때, 멸균된 petri-dish에 배양액을 옮긴 다음, 254 nm의 UV를 20 J 조사시켰다. 이 배양액을 새로운 flask에 옮기고 37°C에서 계속 더 배양하면서, 30분마다 배양액을 1 ml씩 취하여 효소활성 (enzyme activity)을 측정하였다.

## 제 2절 연구결과 및 고찰

### 1. Mitomycin C와 UV를 처리했을 경우, 야생형과 폴리아민 결핍돌연변이 균주에서의 *recA* 유전자의 발현

폴리아민이 *recA* 유전자의 SOS 반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *recA'::lacZ* 융합유전자를 가지고 있는 폴리아민 결핍돌연변이 균주와 야생형 균주에 mitomycin C와 UV를 처리했을 때,  $\beta$ -galactosidase 효소활성을 측정하였다. 최소배지에서의 실험결과는 Fig. 1에 나타나 있다. Mitomycin C를 처리했을 때, 야생형 균주 ACV1003 균주에서의 *recA* 유전자의 발현 정도는 폴리아민 결핍돌연변이 균주에서 보다 높았다 (Fig. 1A). 반면 mitomycin C 처리와는 달리, UV 조사에 의한 *recA*의 발현 정도는 야생형 균주보다 돌연변이 균주에서가 더 높았다 (Fig. 1B).

한편, LB 배지에서는 *recA* 유전자의 발현양상은 최소배지와는 상이하였다. 두 DNA 손상인자에 의한 *recA*의 발현 정도는 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서 야생형 균주보다 모두 높았다 (Fig. 2)

### 2. *recA*의 SOS 반응에 미치는 폴리아민의 효과

Mitomycin C와 UV를 처리했을 경우에 *recA* 유전자의 발현에 미치는 putrescine과 spermidine효과를 분석하였다. 폴리아민을 미리 첨가한 후, mitomycin C를 처리했을 경우에 폴리아민 결핍 돌연변이 균주 TJ17이 야생형 보다 높은 발현을 보였다(Fig. 3). 폴리아민 존재하에서의 돌연변이 균주 TJ17의 induction factor는 폴리아민이 없는 상태에서의 야생형 균주 ACV1003과 유사한 수준으로 회복되었다.

UV 조사실험에서 폴리아민을 미리 처리했을 경우에 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서의 *recA* 유전자의 발현은 폴리아민을 처리하지 않았을 때 보다 폴리아민 전하가에 의존적으로 낮게 나타났다 (Fig. 4). 더구나, 돌연변이 균주의 UV에 의한 *recA* 유전자

의 발현은 폴리아민 존재하에서는 약간의 delay가 있었다.

### 제 3장 결론 및 건의사항

폴리아민은 매우 다양한 생물학적 현상 및 반응에 관여한다고 알려져 왔으나, 그 정확한 생리적 역할 (physiological role)에 대해서는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 폴리아민의 생체내 역할, 특히 유전자 손상방어기작을 설명하기 위하여 폴리아민이 대장균의 SOS 반응에 미치는 영향을 시험하였고 몇가지 중요한 결과를 얻었다.

폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서 mitomycin C처리에 의한 *recA* 유전자의 발현은 야생형 균주에서 보다 낮게 나타났고, 반면에 UV를 조사했을 경우에는 돌연변이 균주에서 더 높게 나타났다. 알킬레이팅 (alkylating) 인자인 mitomycin C는 DNA의 guanine 잔기사이 cross-link를 형성한다 (Freidberg, 1985; Kaasch *et al.*, 1989). *recA* 유전자의 발현은 DNA의 supercoiling 정도에 영향을 받는다고 보고되었다 (Urios *et al.*, 1990). 폴리아민이 결핍된 조건에서 세포내 DNA는 폴리아민이 존재할 때 보다 더 느슨한 상태로 존재한다. 따라서 mitomycin C가 보다 쉽게 DNA에 결합할 수 있지만, 상대적으로 DNA 나선의 파괴는 적게 일어난다. 그러므로 mitomycin C를 처리했을 경우에 *recA* 유전자의 발현이 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서 더 낮게 나타나는 것이다.

폴리아민은 DNA의 수축과 응축을 일으켜서 radiation으로부터 DNA를 보호한다고 알려져 있다 (Newton *et al.*, 1996). 폴리아민 존재하에서 DNA는 좀 더 치밀하게 응축되어있을 것이고, 이것이 UV에 의한 DNA 나선 (strand)의 파괴를 막아줌으로써 SOS 반응이 낮게 일어나는 것이다. 이러한 특성들이 폴리아민을 합성하지 못하는 돌연변이가 UV에 좀 더 민감하여 SOS 반응이 더 크게 일어나는 현상을 설명해 줄 수 있을 것이다.

한편, LB 배지에서는 mitomycin C와 UV를 처리했을 경우에, 폴리아민 결핍 돌연변이 균주에서의 *recA* 발현이 모두 야생형 균주보다 높게 나타났다. 이러한 영양

배지와 최소배지에서의 차이는 각 조건하에서의 DNA의 구조적인 상태의 차이를 반영하는 것으로 판단된다.

폴리아민 의존적인 *recA* 발현을 증명하기 위하여 외부에서 폴리아민을 첨가한 후 mitomycin C와 UV를 처리했을 경우의 *recA* 발현에 미치는 효과를 시험하였다. 세포내 DNA의 supercoiling의 정도는 폴리아민 존재하에서 증가하기 때문에 mitomycin C를 처리하기 전에 폴리아민을 처리하면 supercoil의 강도가 증가하여 mitomycin C의 삽입에 의한 DNA 손상이 증가할 것이다. 따라서, 폴리아민이 결핍된 조건에서보다 부가적으로 SOS 반응이 증가할 수 있을 것이다. 이러한 결과는 대장균의 SOS 반응이 세포내의 폴리아민 수준에 의해서 조절될 수 있다는 것을 제시해 준다.

반면에, 폴리아민 결핍 돌연변이 균주 (polyamine-deficient mutant)에서 폴리아민을 미리 처리한 경우, *recA*의 발현은 감소하였다. 이는 폴리아민이 DNA의 응축과 수축 (compaction and condensation)을 유발하기 때문에 (PICA: Polyamine-Induced Compaction and Aggregation Effect, Newton *et al.*, 1996) UV에 의한 DNA 손상을 감소시킴으로써 *recA*의 발현이 감소하는 것이다.

결론적으로 폴리아민은 DNA 손상인자의 종류에 따라 차등적으로 대장균의 SOS 반응에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 기작이 어떤 방식으로 일어나는지에 대한 좀 더 자세한 연구가 진행되어 진다면, 생체내의 방사선 및 여러 가지 화학적 유전독성물질 (genotoxic materials)에 대한 세포의 방어기작(defense mechanism)을 이해하는데 중요한 기여를 하리라 생각된다.

## REFERENCES

1. Cohn, M. S., Tabor, C. W., Tabor, H. and Wickner, R. B. (1978) Spermidine or spermine requirement for killer double stranded RNA plasmid replication in yeast. *J. Biol. Chem.* 253: 5225-5227.
2. Friedberg, E. C. (1985) DNA repair. New York: WH Freeman and Company.
3. Gaugus, J. M. (1980) Polyamines in biomedical research. Gray Laboratory, Northwood, Middlesex, UK. pp29.
4. Heitman, J., and Model, P. (1991) SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions. *Gene* 103: 1-9.
5. Hung, D. T., Martin, L., Deen, D. F., and Shateri, R. H. (1983) Depletion of intracellular polyamines may alter DNA conformation in 9L rat brain tumor cells. *Science* 221: 368-370.
6. Kaasch, M., Kaasch, J., and Quinones, A. (1989) Expression of the *dnaN* and *dnaQ* genes of *Escherichia coli* is inducible by mitomycin C. *Mol. Gen. Genet.* 219: 187-192.
7. Kenyon, C. J., and Walker, G. C. (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression of specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2819-2823.
8. Khan, A. U., Mei, Y. H. and Wilson, T. (1992) A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11426-11427.
9. Kirino, H., Kuwahara, R., Hamasaki, N. and Oshima, T. (1990) Effect of unusual polyamines on cleavages of DNA by restriction enzymes. *J. Biochem.*



107: 661-665.

10. McMahon, M. E. and Erdmann, V. A. (1982) Binding of spermidine to transfer ribonucleic acid. *Biochem.* 21: 5280-5288.

11. Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

12. Newton, G. L., Aguilera, J. A., Ward, J. F., and Fahey, R. C. (1996) Polyamine-induced compaction and aggregation of DNA - A major factor in radioprotection of chromatin under physiological conditions. *Radiat. Res.* 145: 776-780.

13. Oh, T. J., and Kim, I. G. (1998) Polyamines protect against DNA strand breaks and aid cell survival against irradiation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Tech.* 12: 755-758.

14. Panagiotidis, C. A., Blackburn, S., Low, K. B., and Canellakis, E. S. (1987) Biosynthesis of polyamines in ornithine decarboxylase, arginine decarboxylase and agmatine ureohydrolase deletion mutants of *Escherichia coli* strain K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4423- 4427.

15. Panagiotidis, C. A., Artandi, S., Calame, K., and Silverstein, S. J. (1995) Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acid Res.* 23: 1800-1809.

16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1992) Molecular cloning: A laboratory manual. Second ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.

17. Snyder, R. D., and Lachmann, P. J.(1989) Hyperthermia, polyamine depletion and inhibition of X-ray-induced DNA strand break repair. *Radiat. Res.* 120: 121-128.

18. Spothem-Maurizot, M., Ruiz, S., Sabattier, R., and Charlier, M. (1995) Radioprotection of DNA by polyamines. *Int. J. Radiat. Biol.* 68: 571-577.
19. Tabor, H. and Tabor, C. W. (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
20. Tabor, C. W., and Tabor, H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81-89.
21. Tabor, H., and Tabor, C. W. (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
22. Vollmer, A. C., Belkin, S., Smulski, D. R., Van Dyk, T. K., and LaRossa, R. A. (1997) Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA::lux*, *uvrA::lux* and *alkA::lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2566-2571.
23. Urios, A., Herrera, G., Aleixandre, V., and Blanco, M. (1990) Expression of the *recA* gene is induced in *Escherichia coli* topoisomerase I mutants. *Mutat. Res.* 243: 267-272.
24. Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribo-nucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48: 60-93.
25. Williams, J. R., Casero, R. A., and Dillehay, L. E. (1994) The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cell *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201: 1-7.
26. Witkin, E. M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40: 869-907.

Table 1. Strains used in this study

Strains	Relevant genotype	Source or reference
CAG12168	$\lambda$ - <i>speA210::Tn10 rph-1</i>	CGSC <sup>a</sup>
MA255	$\lambda$ - <i>thr-1 leuB6 fhuA2 lacY1 glnV44(AS) gal-6</i> <i>relA1 can-1 speB2 speC3 rpsL133 xylA7 mtlA2 thi-1</i>	CGSC <sup>a</sup>
KH1366	Hfr (Cavalli) $\lambda$ - <i>metD88 dnaQ49(ts) <math>\Delta</math> lac-6 tsx-7</i> <i>srl-8 relA1 spoT1 metB1</i>	CGSC <sup>a</sup>
TJ12	MA255, but <i>leu<sup>+</sup> thr<sup>+</sup> <math>\Delta</math> lac-6</i>	MA255XKH1366 <sup>b</sup>
TJ13	TJ12, but <i>speA210::Tn10</i>	TJ12XCAG12168 <sup>b</sup>
ACV1003	RFM443/pRecALac1	Vollmer et al (1997)
TJ17	TJ13/pRecALac1	This study

<sup>a</sup> Coli Genetic Stock Center of Yale University: These strains generously provided by Dr. Berlyn of CGSC.

<sup>b</sup> The  $\Delta$ *lac-6* mutation was introduced by selecting for streptomycin resistance and *thr<sup>+</sup>*.

<sup>c</sup> The *speA210::Tn10* mutation was introduced by selecting for tetracycline resistance.

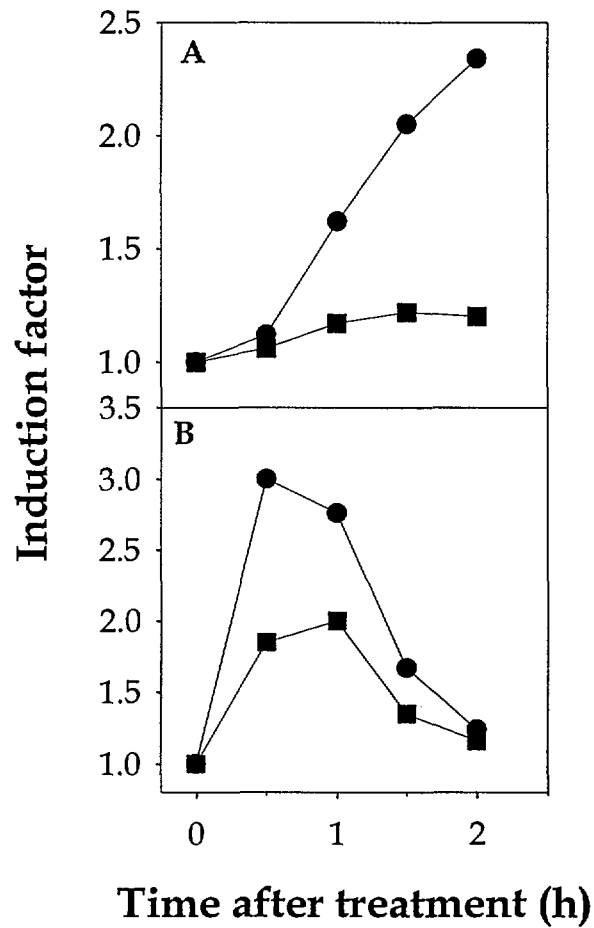


Fig. 1. Induction of *recA* gene expression by MC-treatment (A) and UV-irradiation (B) on minimal medium. Cultures of TJ17 (circles) and ACV1003 (squares) carrying pRecALac1 (*recA'*::*lacZ* transcriptional fusion) were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.2 - 0.4 on glucose minimal medium and the test cultures were treated with MC (1 ug/ml) and UV (20 J/m<sup>2</sup>) at 0 h.

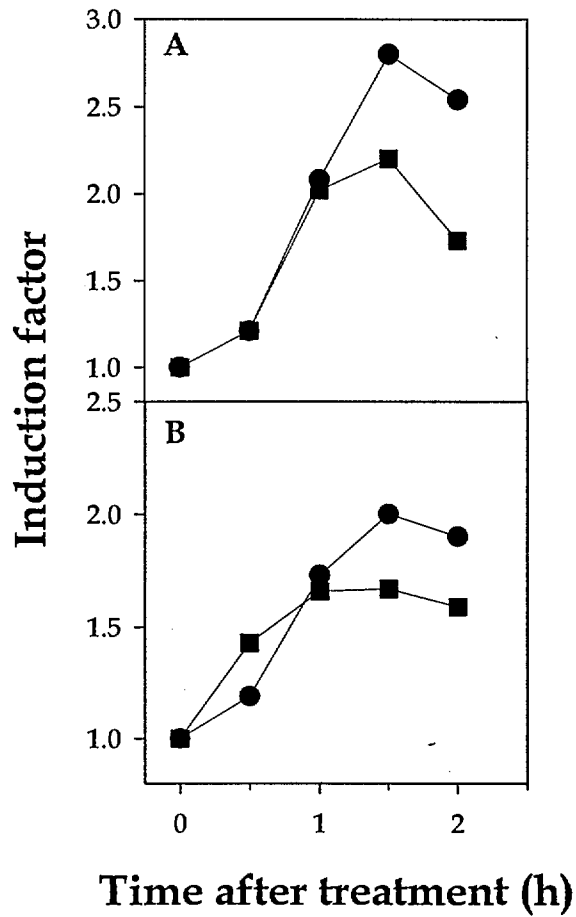


Fig. 2. Induction profiles of *recA* gene by MC-treatment (A) and UV-irradiation (B) on LB medium. Cultures of TJ17 (circles) and ACV1003 (squares) were grown to an  $OD_{600}$  of 0.2 - 0.4 and cultures were treated with MC (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and UV (20  $\text{J}/\text{m}^2$ ) at 0 g.

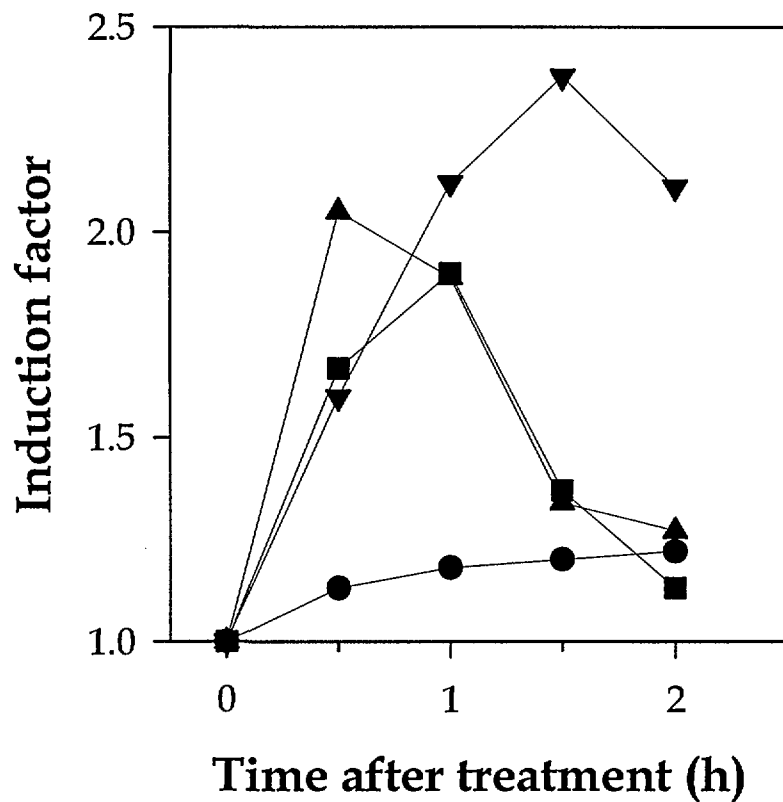


Fig. 3. Effects of polyamines on the *recA* gene expression by MC. Cultures of TJ17 was grown to an  $OD_{600}$  of 0.2 - 0.4 on glucose minimal medium pretreated with polyamines Put (square) and Spd (up-triangle) at final concentration of each 0.1 mM, and without polyamine (circle) at 1 h before addition of MC (1 ug/ml). Culture of ACV1003 was treated with MC in the absence of polyamine (down-triangle).

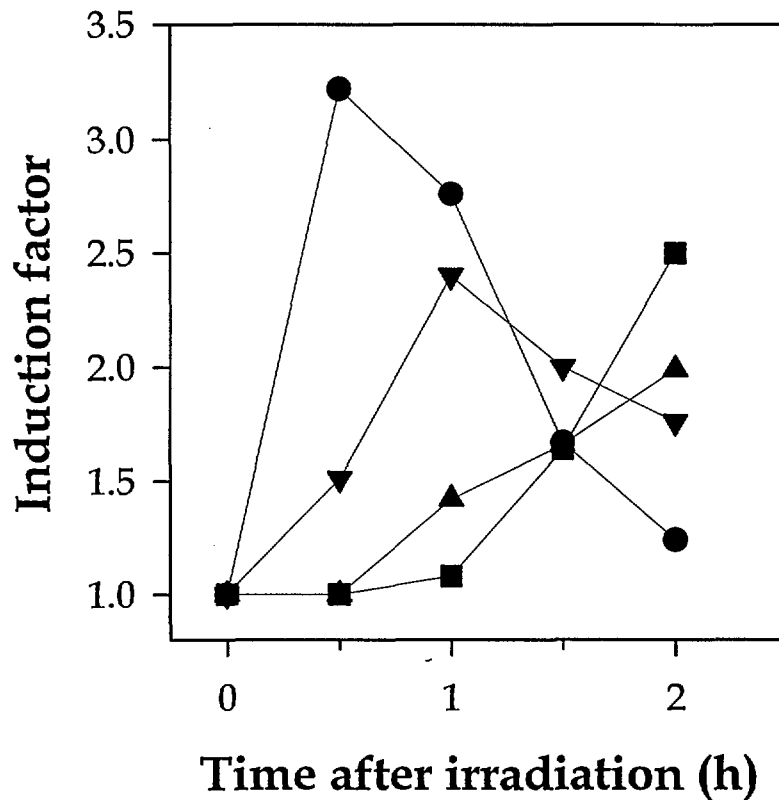


Fig. 4. Effects of polyamines on the *recA* gene expression by UV-irradiation. Cultures of TJ17 was grown to an  $OD_{600}$  of 0.2 - 0.4 on glucose minimal medium pretreated with polyamines Put (square) and Spd (up-triangle) at final concentration of each 0.1 mM, and without polyamine (circle) at 1 h before irradiation ( $20 \text{ J/m}^2$ ). Culture of ACV1003 was irradiated with UV in the absence of polyamine (down-triangle).

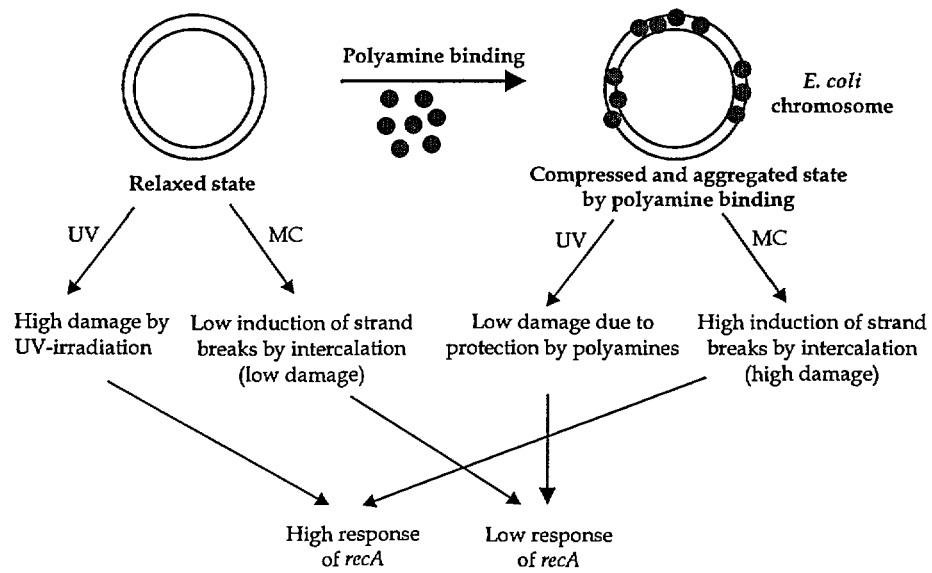


Fig. 5. A schematic model of the polyamine effect on the *recA* response by MC-treatment and UV-irradiation. Circles indicate polyamines and arrows indicate the flow of signal.



## 서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-1858/98			
제 목 / 부 제	방사선에 의한 유전자 손상방어 기술연구		
연구책임자 및 부서명	이 정 호 (방사선환경안전연구팀)		
연구자 및 부서명	김 인 규 (방사선생체영향해석분야), 이 강 석 ( " ), 김 국 찬 ( " ), 오 태 정 ( " )		
발 행 지	대 전	발행기관	한국원자력연구소
발행일	1999. 1. .		
페이지	30 p.	도 표	유(√), 무( )
크 기	cm		
참고사항	'98 기관고유사업, 원자력기반연구		
비밀여부	공개(√), 대외비( ), 급비밀	보고서종류	연구보고서
연구위탁기관		계약 번호	
초록 (300 단어 내외)	<p>대장균의 SOS 반응은 RecA에 의해서 양성적으로 조절된다, 대장균의 SOS 반응에 미치는 폴리아민의 영향을 시험하기 위해서 <i>recA'::lacZ</i> 융합유전자를 가지고 있는 폴리아민 결핍돌연변이 균주와 야생형 균주에서의 <i>recA</i> 유전자의 발현을 연구하였다. 그 결과, 폴리아민이 결핍된 조건에서 mitomycin C에 의한 <i>recA</i>의 발현은 야생형에서 더 높게 일어났으며, 반면에 UV에 의한 발현은 돌연변이에서가 더 높게 일어났다. 폴리아민 결핍돌연변이에 외부에서 폴리아민을 첨가해 주면 <i>recA</i>의 발현이 야생형의 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 폴리아민이 DNA 손상인자에 의한 세포내 방어기작에 아주 중요한 역할을 한다는 것으로 제시해 주는 결과이다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)			
주제어: 대장균, SOS 반응, RecA, 폴리아민, mitomycin C, UV, 세포내 방어기작			

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No		Standard Report No.	INIS Subject Code	
KAERI/RR-1858/98					
Title/Subtitle	Protection of DNA Damage by Radiation Exposure				
Project Manager and Dept.	Jeong Ho Lee(Environment Radiation Research Dept.)				
Researcher and Dept.	In Gyu Kim (Radiation Biology Dept.), Kang Suk Lee( " ), Kug-Chan Km( " ), Tae-Jung Oh( " )				
Pub. Place	Daejeon	Pub. Org	KAERI	Pub. Date	1999. 1. .
Page	30 p.	Fig. and Tab.	Yes(√), No( )	Size	cm
Note	'98 Annual report				
Classified	Open(√), Outside( ),	Class	Report type	Research Report	
Sponsoring Org.			Contract No.		
Abstract (About 300 Words)	<p>The SOS response of <i>Escherichia coli</i> is positively regulated by RecA. To examine the effects of polyamines on the SOS response of <i>E. coli</i>, we investigated the expression of <i>recA</i> gene in polyamine-deficient mutant and wild type carrying <i>recA'::lacZ</i> fusion gene. As a result, <i>recA</i> expression by mitomycin C is higher in wild type than that of polyamine-deficient mutant, but <i>recA</i> expression by UV radiation is higher in wild type than that of mutant. We also found that exogenous polyamines restored the <i>recA</i> expression in the polyamine-deficient mutant to the wild type level. These results proposed that polyamines play an important role in mechanism of intracellular DNA protection by DNA damaging agents.</p>				
Subject Keywords (About 10 Words)					
keywords : <i>Escherichia coli</i> , SOS response, RecA, mitomycin C, UV, mechanism of intracellular protection					