

다차원 NMR 기법을 이용한 생체고분자
입체구조 연구사업

Studies on the Structures of Biomolecules
by Using Multi-dimensional NMR Methods

기초과학지원연구소

과 학 기 술 부

요 약 문

I. 제목 : 다차원 NMR 기법을 이용한 생체고분자 입체구조 연구사업

II. 연구개발의 목적 및 필요성

단백질 및 RNA의 3차원적 입체구조 규명 방법은 NMR과 X-ray crystallography만이 유일한 방법으로 알려져 있다. 따라서 이를 통한 생체물질의 구조규명 기술 개발과 아울러 구조와 기능의 관계를 밝히는 작업을 정착화시키는 것은 그 자체가 특정물질 개발에 직접 응용될 뿐 아니라 계속되는 물질개발 연구에 바탕이 되는 원천기술로서의 역할을 하므로 적극적인 투자가 필요한 분야이다. 최근의 NMR과 X-ray crystallography의 기법상의 발전은 단백질의 구조를 밝히는데 많은 기여를 하였다. 그리고 1990년 초부터 RNA에도 NMR 기법이 적용되기 시작하여 현재까지 수십개의 RNA high-resolution 구조가 규명되었다. 그러나 RNA는 시료 준비가 매우 까다롭고 crystal이 잘 형성되지 않으며 NMR spectrum 상에서도 공명선이 중첩되는 관계로 단백질이나 DNA에 비해 비교적 적은 수의 구조만이 알려져 있을 뿐이다.

본 연구에서는 생체고분자, 그 중에서도 구조규명이 난이하다고 알려진 RNA의 3차원적 입체구조를 다차원다핵종 NMR 기법으로 규명하는 방법을 확립하였다. 국내에서는 아직 이 기반기술이 확립되지 않았기 때문에 RNA 구조분야의 세계적 대가인 UC Berkeley의 Tinoco 교수(미국 National Academy of Sciences 회원)와 공동으로 본 과제를 추진하였다. 본 연구팀에 의해 독자적으로 새롭게 개발된 NMR 기법은 탄수화물 구조 정량분석법과 shaped pulse를 사용한 핵산 공명선 지정기법, 그리고 DNA 사중나선 정량기법 등이다. 이러한 기술과 기 개발된 기술을 적용하여 본 연구에서 손상된 DNA, influenza A virus의 promoter region, Sc Virus RNA의 packaging signal region 등의 구조를 규명하였다. 본 과제의 연구결과는 SCI 등 록 국제 학술지에 6편을 발표하였고 4편을 투고하였으며 1편의 논문 제출을 준비중에 있다. 본 과제에 의해 개발된 다차원다핵종 NMR 기법은 기기교육과 workshop, 학회 발표 등을 통하여 국내 연구자들에게 보급하여 연구에 활용할 수 있도록 조치하였다.

III. 연구개발의 내용 및 결과

1. NMR 구조규명 기반기술 개발

- (1) 동위원소 치환 RNA 시료 합성기술
- (2) 다차원 다핵종 NMR 기술 : DQF-COSY, TOCSY, NOESY, HMQC, HSQC, HETCOR, HET-TOCSY, HET-TOCSY-NOESY, HSQC-NOESY, HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, HCCH-Relay
- (3) 새로운 Pulse sequence 개발 : Pyrimidine-filtered pulse sequence
- (4) 생체분자 입체구조 모델링 기술

2. 탄수화물 구조분석기술 개발

β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan은 인간의 면역시스템을 증진하고 자극하는 특성을 가지고 있어 생체반응 변경자(Biological Response Modifiers : BRMs)라고 불린다. 지금까지의 수많은 연구결과로 보면 가지화 정도(Degree of Branching)와 화학적 변화에 따라 β -glucan의 분자량(MW)과 수용액에 대한 용해도가 결정되는데, 이러한 점이 BRM으로 임상적으로 사용될 수 있는지를 결정 할 때 중요하게 작용한다. 임상적으로 유용한 glucan의 분자량 범위는 100KD-200KD이고 가지화 정도(DB)는 0.2-0.5이다. 그 동안 NMR 스펙트럼의 복잡함과 분자의 응집문제 때문에 큰 β -D-(1 \rightarrow 3)-glucan의 분자구조는 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 분석할 수 없었다. 그것은 β -glucan들의 구분이 가능한 다른 AGU들의 매우 작은 피크들을 완전히 해석하는 것은 불가능했기 때문이었다. 이런 매우 작은 피크를 확인할 수 있어야만 $^1\text{H NMR}$ 스펙트럼으로 DB와 DP를 결정할 수 있다. 매우 작은 피크들은 환원말단수소-1(RT), 비환원말단수소-1(NRT), 환원말단의 바로 이웃하는 두 번째 AGU의 수소-1(SRT), 결사슬에서의 말단 AGU의 수소-1(TSC), 결사슬(SC)의 말단 AGU를 제외한 모든 AGU들의 수소-1, 등이다.

본 과제에서 우리는 BRM 특성을 가지는 β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan 류들의 구조적 특성을 $^1\text{H NMR}$ 분광법을 사용하여 최초로 결정하였고, 다양한 AGU들의 1번 수소들을 완벽하게 확인하였다. 또한 $^1\text{H NMR}$ 분광법으로 간단하고 비파괴적으로 DPn값 540인 pachyman정도의 분자량인 β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan의 DPn과 DP의 결정하는 방법을 제시하였다.

3. DNA 사중나선 정량기술 개발

CpG oligodeoxynucleotide(ODN)는 innate와 adaptive immunity를 activating시

킬 수 있는 물질로 알려져 있다. CpG ODN의 endosome으로의 entry는 immunostimulatory 기능에 매우 중요한 것으로 보인다. DNA가 포유류의 세포막에 binding하는 것은 알려져 있지만, 아직 receptor는 밝혀진 바가 없다.

포항공대 성영철 교수팀은 dG run이라 불리는 consecutive dG residue를 CpG ODN에 붙임으로써 immunostimulatory 기능을 향상시킨다는 사실을 발견하였다. 구체적으로, CpG ODN의 3'-말단에 dG run을 붙일 경우 mouse splenic dendritic cell에서 TNF- α 와 IL-12가 상당히 증가하는 것을 관측하였다. 최적의 dG 길이는 6개 인 것으로 밝혀졌다. 반면, 5'-말단에 dG run을 붙일 경우 오히려 cytokine induction을 감소시키는 결과가 관측되었다.

dG run의 위치에 따라 cytokine induction이 달라진다는 것은 dG run의 위치에 따라 사중나선 구조의 형성 여부가 결정되는 것인가에 대한 의문점을 제기한다. 아니면, 사중나선이 위치와 관계없이 형성이 되는데 다른 기작에 의하여 induction이 달라질 수도 있다. 이 점을 밝히기 위하여 본 연구에서 NMR을 사용하여 사중나선 구조의 population을 측정하는 정량방법을 개발하였다.

dG run이 scavenger receptor (SR) activity를 방해한다는 것은 이미 보고된 바 있다. 본 연구에서는 여러 길이의 dG run과 dG run이 부착되는 위치가 어떻게 activity에 영향을 미치는가를 파악하기 위하여 NMR spectrum을 이용하였다. 사중나선은 10-12 ppm에 공명을 일으키는 imino proton peak를 보여준다. 반면 Watson-Crick base pair는 12-15 ppm에 imino proton이 공명을 일으킨다. 따라서 두 영역의 imino proton 공명선의 peak integration 값을 비교하면 사중나선 구조와 Watson-Crick base pair를 하는 hairpin 혹은 duplex 구조의 population 비를 구할 수 있다. 본 연구에서 cytokine induction에 사용된 여러 ODN에 대하여 G-quartet 구조와 Watson-Crick 구조의 비를 계산하였다. 4개 혹은 그 이상의 dG residue를 가진 ODN은 모두 위치에 관계없이 사중나선 구조를 형성하였다. dG run이 길수록 사중나선의 population은 증가하였다. 3'-말단에 위치한 dG run의 경우 5'-말단보다 더 효과적으로 사중나선이 형성됨이 관측되었다. 이것은, 3'-말단의 dG ODN이 5'-말단의 dG ODN보다 cellular binding이 더 효과적이라는 실험 결과와 일치한다.

4. AA Mismatch DNA 구조 규명

본 연구는 데옥시리보핵산의 수용액상태에서의 구조를 밝히기 위하여 수행되었는데, 불일치 염기쌍을 포함하고 있는 핵산의 구조에 관심을 갖고 살펴보았다. 불일치 염기쌍은, 비록 핵산이 비록 이중나선구조로 되어있어서 염기가 잘 변형되지 않지만, 생체내에서 핵산을 복제하거나 재결합할 때 생길 수 있으며, 이러한 잘못된 염기쌍들은 리보핵산으로 전사할 때 잘못된 리보핵산을 만들고 다시 잘못된 단

백질을 합성하게 되므로 반드시 고쳐야 한다. 고침효소는 잘못된 염기를 인식하여 작용하게 되는데, 그 효율이 불일치 염기쌍의 종류와 그 이웃한 염기서열에 따라서 달라진다. *Escherichia coli*에서 고침효율은 불일치 염기쌍에 따라 다른데, A-C, G-G, G-T의 경우가 가장 좋고, 그 다음이 A-A의 염기쌍이며, A-G, C-C, C-T, T-T의 경우가 가장 나쁘다. 이러한 효율의 차이를 직접 구조적인 차이와 상관이 있다고 결론 내리기는 어렵지만, 아마도 구조적인 차이가 고침작용에 참여하는 효소들에 영향을 미칠 것이라고 믿기 때문에, 부분적으로든 전체적으로든 Watson-Crick의 염기쌍과는 다른 구조를 하고 있는 불일치 염기쌍의 구조에 관심을 갖게 되었다.

본 연구에서는 불일치 염기쌍인 아데닌 염기의 이웃한 염기서열이 서로 같지 않은 두 개의 올리고머를 합성하여 구조를 비교하여 보았다. 사용한 핵산 시료의 염기서열은 자체로 대칭구조를 갖기 때문에 스스로 이중나선구조를 이룰 수 있도록 하였고, 아데닌 불일치 염기쌍 결의 염기쌍이 서로 다른 두 개의 핵산, 5'-d(CGAGAATTCACG)와 5'-d(CGACAATTGACG)을 대상으로 연구하였다. 본 연구 결과, 이들 두 올리고머는 구조적으로 또한 열역학적인 안정성 면에서 상당한 차이를 보였다. 그리고 low pH에서 평행이중나선 형성에 대한 경향도 차이가 있는 것으로 나타났다.

5. 인플루엔자 바이러스 RNA 구조 규명

Influenza A virus는 orthomyxoviridae family에 속하며 그 genome은 8개의 negative-sense single-stranded RNA 분자로 구성된다. 이 8개의 RNA는 세 개의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 단백질 PA, PB1, PB2와 nucleoprotein NP 등 모두 10개의 단백질을 encoding한다. Viral genome의 전사와 복제는 감염된 세포의 핵 내에서 세 개의 RdRp와 NP, 그리고 viral RNA (vRNA)로 이루어진 ribonucleoprotein (RNP) complex에 의해 수행된다. 복제의 과정을 통하여 vRNA로부터 positive-sense의 full-length cRNA가, 그리고 cRNA로부터 vRNA가 만들어진다. 전사 또한 같은 RNP complex에 의해 수행되지만, 복제와 달리 host mRNA의 7-methyl guanosine cap 구조에 의해 initiation 되며 cRNA보다 15~22개 짧은 mRNA가 만들어지며 poly(A) tail이 생성된다는 점이 다르다.

Influenza A virus의 RdRp는 RNA의 5' 말단과 3' 말단에 의해 이루어지는 partial duplex promoter를 인식하여 결합한다. 이 부위는 소위 panhandle RNA라고도 불린다. 이 panhandle RNA는 influenza A virus의 변이체들 중에서 염기서열이 보존되는 특이한 부위이다. 이 promoter 부위는 복제와 genome packaging에 필요한 모든 신호를 포함하고 있는 것으로 보인다. 또한 이 부위는 전사의 initiation과 termination, 그리고 polyadenylation의 regulation에 관여한다는 몇 가지 증거가 보고되었다. RdRp는 RNA를 template로하여 바로 RNA를 합성하는 효소

로서 대부분 virus에서 gene이 발견된다. RdRp의 이런 특이한 성질에도 불구하고 RdRp의 RNA 합성 및 promoter 인식 기작에 대하여는 아직까지 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 RdRp가 인식하는 promoter인 소위 panhandle RNA의 구조를 규명함으로써 promoter와 RdRp의 상호작용 및 기작에 대한 인식에 기여를 하고자 하였다. Panhandle RNA의 염기서열은 NMR 구조 연구에 필요한 RNA 합성 기술 상의 난점으로 인하여 wild-type 염기서열을 변형한 RNA의 구조를 우선 규명한 후, 다시 wild-type 염기서열의 RNA 구조를 규명하였다.

6. *Saccharomyces cerevisiae* virus RNA 구조 규명

Hairpin loop과 bulge는 단백질 인식과 결합, RNA folding을 위한 중요한 구조적 모티프이다. 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에 존재하는 double-stranded RNA 바이러스 L1 (ScVL1)의 Cap-Pol fusion 단백질은 바이러스의 plus strand RNA 중 짧은 부분을 인식한다. 이 부위를 viral binding site (VBS)라고 하는데, 이것은 바이러스 particle이 plus strand에 결합할 때와 바이러스 RNA를 packaging할 때 중요하다. Stem-and-loop로 이루어진 이 부위는 5개의 뉴클레오타이드로 이루어진 loop와 internal bulge-loop을 구성요소로서 포함하고 있다. ScVL1은 하나의 VBS를 가지고 있는 반면, ScVL1의 satellite 바이러스인 ScVM1은 두 개의 VBS를 가지고 있다. 현재까지 Cap-Pol fusion 단백질과의 결합에 중요하다고 알려진 요소는 stem의 존재, loop의 염기 서열, bulge를 이루는 adenosine 잔기이다. 일부 strain에 존재하며, L1 바이러스에 의해 제공되는 ScV particle에 분리되어 packaging되는 ScVM1은 단지 두 가지 단백질만을 생산하는데, the killer toxin과 그 toxin에 면역성을 보이는 단백질이 그 둘이다. 이 toxin의 phenotype을 이용해 L1 바이러스 시스템의 유전학적 분석이 이루어졌다. ScVL1, ScVM1 바이러스 시스템은 상당히 연구가 많이 이루어져 있다.

본 연구에서는 ScVM1의 두 VBS RNA SL1과 SL2의 용액 상의 3차 구조를 핵자기 공명분광법과 restrained molecular dynamics를 이용하여 규명하였다. 본 연구 결과를 요약하면, (1) 바이러스의 plus strand와 viral particle의 결합, RNA packaging에 중요한 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 M1 double-stranded RNA 바이러스의 SL1과 SL2 VBS RNA의 3차 구조를 핵자기공명법에 의해 규명하였다. (2) 최종적으로 high-resolution 구조를 획득하였으며, average pairwise RMSD 값은 각각 전체 분자에 대해 SL1은 1.28 Å, SL2는 1.29 Å이다. (3) Penta loop을 형성하지만, loop 아래에 있는 G의 imino proton과 C의 O2가 수소결합을 형성한다. Loop 부분의 염기 stacking은 5'-side 측에서 3번째 잔기까지 계속된다. 3개의 피리미딘 염기는 모두 major groove로 향하며, 이는 Cap-pol protein과의 상호작용시 major

groove 쪽이 인식되리라는 점을 시사한다. (4) SL1의 Bulged A5 잔기는 stem 안으로 stack된 conformation을 보여준다. 하지만 bulged-out conformation이 일정 시간 존재함을 제시하는 예외적인 NOE가 존재한다. (5) SL2의 internal loop는 dynamic한 conformation을 보여준다. 하지만 base-phosphate hydrogen bonding에 의해서 안정화되어 있다. (6) Loop 부분과 upper-stem의 rigid conformation은 SL1 과 SL2 VBS RNA가 그 자체의 conformation 변화를 많이 거치지 않고 Cap-Pol protein과 상호작용할 수 있음을 시사한다.

IV. 연구개발 결과의 활용 계획

최근 human genome project가 성공적으로 종료됨에 따라 전 세계적으로 structural genomics와 structural proteomics에 대한 열기가 고조되고 있다. 미국, 일본을 포함한 선진국은 대규모의 NMR 시설과 X-ray 시설을 투자하여 high-throughput 구조규명 project를 시작하였고 국내에서도 정부 주도 및 민간 산업체 주도 하에 다수의 생체분자 구조규명 사업을 기획하고 있다. 이러한 시점에서 본 연구개발 결과는 생체분자, 특히 RNA 구조규명과 신약개발에 즉각 활용될 수 있을 것이다. 본 개발 기술은 신약 등의 제품 후보물질 도출에 활용될 수 있다. 실제로 국내 및 국외 제약회사는 신약개발에 NMR과 X-ray 방법을 사용하고 있다. 본 과제에서 구조가 규명된 influenza virus RNA의 경우 독감치료제 개발에 활용될 수 있을 것이다. 또한 RNA 구조규명 기법이 확립되었으므로 HIV 등 여러 RNA virus의 genome을 target으로 공격하는 신약개발을 활성화시킬 수 있을 것이다. 따라서 structural genomics 등, 구조생물분야의 대규모 사업이 정부 차원에서 시급히 마련되어 post-genome 시대의 경쟁에서 우리나라도 선진국에 뒤지는 일이 없어야 할 것이다

CONTENTS

Chapter 1	Introduction -----	10
Chapter 2	Current Status of Research and Development -----	11
Chapter 3	Results and Discussion -----	13
	1. Developments of NMR Methods in Structure Determination -----	13
	2. Structure of Unusual DNA -----	50
	3. Structure of Influenza Virus RNA -----	101
	4. Structure of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Virus RNA ----	120
Chapter 4	Future Direction -----	141

목 차

제 1 장	서 론 -----	10
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	11
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 -----	13
제1절	NMR 구조규명 기반기술 -----	13
	1. 동위원소 치환 RNA 시료 합성 기술 -----	14
	2. 다차원 다핵종 NMR 기술 -----	16
	3. 생체분자 입체 구조 모델링 기술 -----	20
	4. 탄수화물 구조분석 기술 -----	23
	5. DNA 사중나선 정량 기술 -----	31
	6. 참고 문헌 -----	33
	Tables and Figures -----	37
제2절	손상된 DNA 구조 규명 -----	50
	1. AA Mismatch DNA 구조 -----	50
	가. 서론 -----	50
	나. 실험 방법 -----	52
	다. 결과 및 토의 -----	57
	라. 참고 문헌 -----	61
	Tables and Figures -----	64
	2. UV 손상 DNA Base 구조 -----	72
	가. 서론 -----	72
	나. 실험 방법 -----	74
	다. 결과 및 토의 -----	75
	라. 결론 -----	83
	마. 참고 문헌 -----	84
	Tables and Figures -----	86
제3절	인플루엔자 바이러스 RNA 구조 -----	101
	1. 서론 -----	101
	2. 실험 방법 -----	102
	3. 결과 및 토의 -----	104
	4. 참고 문헌 -----	110
	Tables and Figures -----	112
제4절	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus RNA 구조 -----	120
	1. 서론 -----	120
	2. 실험 방법 -----	122
	3. 실험 결과 -----	124
	4. 토의 -----	129
	5. 결론 -----	133
	6. 참고 문헌 -----	134
	Figures -----	136
제 4 장	연구개발 결과의 활용 및 계획 -----	141

제1장 서론

Human Genome Project 이후 gene product인 단백질과 RNA의 입체구조를 규명함으로써 유전자의 기능을 파악하고자 하는 structural genomics가 최근 급부상하고 있다. 이것은 유전자를 신약개발 및 단백질공학에 활용하기 위하여서는 유전자의 기능 및 단백질의 구조 규명이 반드시 필요한 단계이기 때문이다. 단백질 및 RNA의 3차원적 입체구조 규명 방법은 NMR과 X-ray crystallography 만이 유일한 방법으로 알려져 있다. 따라서 이를 통한 생체물질의 구조규명 기술개발과 아울러 구조와 기능의 관계를 밝히는 작업을 정착화시키는 것은 그 자체가 특정물질 개발에 직접 응용될 뿐 아니라 계속되는 물질개발 연구에 바탕이 되는 원천기술로서의 역할을 하므로 적극적인 투자가 필요한 분야이다.

최근의 NMR과 X-ray crystallography의 기법상의 발전은 단백질의 구조를 밝히는데 많은 기여를 하였다. 그리고 1990년 초부터 RNA에도 NMR 기법이 적용되기 시작하여 현재까지 수십개의 RNA high-resolution 구조가 규명되었다. 그러나 RNA는 시료 준비가 매우 까다롭고 crystal이 잘 형성되지 않으며 NMR spectrum 상에서도 공명선이 중첩되는 관계로 단백질이나 DNA에 비해 비교적 적은 수의 구조만이 알려져 있을 뿐이다. 1980년 초 ribozyme (catalytic RNA) 등의 발견으로 RNA의 기능이 유전정보의 전달에만 국한되는 것이 아니라 효소의 기능까지 가질 수 있다는 사실이 알려지면서 그 구조에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 생체고분자, 그 중에서도 구조규명이 난이하다고 알려진 RNA의 3차원적 입체구조를 다차원다핵종 NMR 기법으로 규명하는 방법을 확립하고자 하였다. 국내에서는 아직 이 기반기술이 확립되지 않았기 때문에 RNA 구조분야의 세계적인 대가인 UC Berkeley의 Tinoco 교수(미국 National Academy of Sciences 회원)와 공동으로 본 과제를 추진하였다. Tinoco 교수로부터 최근에 개발된 동위원소 치환 RNA 시료 합성기법과 다차원다핵종 NMR 기법을 공동연구를 통하여 전수받고, 국내 연구팀에서도 새로운 다차원다핵종 NMR 기법을 개발하여 다양한 시료의 구조규명에 적용하였다. 본 연구팀에 의해 독자적으로 새롭게 개발된 NMR 기법은 탄수화물 구조 정량분석법과 shaped pulse를 사용한 핵산 공명선 지정기법, 그리고 DNA 사중나선 정량기법 등으로서 제3장 1절에 상세히 보고하였다. 이러한 기술과 기 개발된 기술을 적용하여 본 연구에서 입체구조를 규명한 생체고분자는 손상된 DNA, influenza A virus의 promoter region, Sc Virus RNA의 packaging signal region 등으로서 제3장 2절에 구조 및 생물학적 의미를 기술하였다. 본 과제의 연구결과는 SCI 등록 국제 학술지에 6편을 발표하였고 4편을 투고하였으며 1편의 논문을 제출을 준비중에 있다. 본 과제에 의해 개발된 다차원다핵종 NMR 기법은 기기교육과 workshop, 학회 발표 등을 통하여 국내 연구자들에게 보급하여 연구에 활용할 수 있도록 조치하였다.

제2장 국내외 기술개발 현황

NMR은 최근 기술상의 획기적인 발전으로 생체고분자물질의 연구에 있어서 아주 강력한 방법으로 자리매김을 하고있다. 그럼에도 생체고분자물질의 물성, 즉 분자량이나 용해도 등이 NMR에 의한 구조연구의 걸림돌로 작용하고 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 새로운 방법들이 계속 개발되고 있지만 그 과정이 무수한 시행착오를 거쳐야 하는 실정이다. 실례로 단백질이나 핵산의 수소를 모두 중수소로 치환하는 deuterium labeling technique이나 특정 아미노산의 특정원자를 ^{13}C 또는 ^{15}N 으로 labeling하는 방법들은 공명선을 단순화하여 구조해석에 큰 도움을 주지만, 그것을 특정한 단백질에 적용하기 위해서는 최적화에 대한 상당한 노력이 필수적이며, 거기에 고액의 동위원소 물질이 필요하므로 재정적인 어려움이 따르게 되는 것이다. 따라서 이러한 연구에 있어서는 어느 개인 또는 연구소만의 노력으로는 해결할 수가 없는 부분이 많기에 정부나 관련기관의 적극적인 협조가 필요하다.

RNA는 crystallization이 매우 어렵기 때문에 NMR에 의한 구조연구에 많은 노력을 들이고 있다. 그러나 NMR도 ribose의 수소핵 공명선이 DNA와는 달리 중첩이 심하므로 규명할 수 있는 RNA 분자 크기가 제한되어 있다. 현재로서는 RNA 시료에 isotope labeling을 하지 않을 경우 25-30 nucleotide(10kD 미만) 정도의 크기가 가능하며 isotope labeling을 할 경우에는 60 nucleotide(20kD) 정도의 크기가 가능하다. 따라서 현재의 NMR 기법으로 rRNA 전체 구조를 밝히기는 아직 이르다고 할 수 있다. 그러나 RNA의 경우 secondary structural motif의 구조가 대개는 folding된 전체 분자 내에서 그 구조를 유지하는 것으로 알려져 있으므로 building motif들 개개의 구조 규명을 종합할 경우 전체적인 구조에 대한 modeling이 가능할 것으로 여겨진다. 또한, structural element들이 rRNA의 특정 기능이나 protein-binding과 연계되어 있으므로 개개의 motif에 대한 구조적 연구는 기능과 바로 연결하여 해석할 수 있으므로, 많은 연구 그룹들이 RNA의 특정 부위만 골라 구조적 연구를 수행하고 있다.

현재 생체분자 구조규명에 활용할 수 있는 NMR의 국내 보유현황은 500MHz가 대학, 기업, 연구소를 합하여 10여대, 600MHz는 KIST, 생명공학연구소, LG 연구소, 서울대 공동기기원, 서울대 농대 및 본 연구소에 총 6대가 있으며 상용화된 것 중에 최고의 분해능을 주는 900MHz나 800MHz는 아직 국내에 없다. 이 분야의 전문인력도 최근에는 어느 정도 확보되어 이제는 국내에서도 생물물리학자, 분자생물학자들 간의 상호협력을 통해 NMR을 이용한 생체분자 입체구조 규명에 관한 연구를 시도할 단계에 이르렀다.

외국의 경우 NMR이나 X-ray crystallography를 이용하여 핵산, 단백질 등의 초정밀구조를 분석한 연구는 매는 수백편의 논문으로 발표되고 있고 각 대학과 연구소에는 1-2개의 NMR과 X-ray 구조규명 연구팀을 보유하고 있다. 본 과제와 관련된

연구개발사례로 미국 Yale 대학의 Peter B. Moore 연구팀과 Chicago대학 Agarwal 연구팀이 E. coli 23S rRNA의 domain VI 구조를 NMR로 규명하고 ricin, α -sarcin 등 cytotoxin들과의 interaction을 밝힘으로써 현재 새롭고 강력한 항생제 개발로 연구가 이어지고 있다. 그리고 Yale 대학의 T.A. Steitz 연구팀에서 glutamyl-tRNA synthetase와 tRNA^{Gln}의 complex, reverse transcriptase (RT) 등의 crystal 구조를 규명함으로써 RT를 target으로 하는 AIDS 치료제 개발이 전세계적으로 활발히 진행되고 있다.

국내에서는 구조생물학에 대한 중요성이 아직 깊이 인식되지 못한 관계로 외국과 같이 활발한 연구개발이 수행되고 있지는 못하나, 10년 전부터 귀국하기 시작한 젊은 연구자들을 중심으로 관련 분야가 점점 활성화되고 있다. 외국의 경우 생체 분자구조에 관한 연구는 제품개발로 바로 연계되는 경우가 많다. 국내에서는 아직 구조가 규명된 생체물질의 수가 적기 때문에 제품개발을 기대하는 것은 이르다고 할 수 있으나 최근 human genome project 이후의 structural genomics와 structural proteomics 연구에 기대를 걸어볼직 하다.

구조규명에 대한 외국의 기술수준은 분자량 30-40kD에 달한다고 평가하겠다. 국내에서도 15-20kD의 연구결과가 있고 현재 활발한 연구가 이루어지므로 질적으로는 선진국과 크게 뒤떨어지지 않는다고 하겠다. 그러나, 양적으로 비교해 보았을 때, 그 차이는 매우 크다. 외국의 경우 거의 모든 대학(박사 학위과정인 대학)이 다수의 구조생물학자를 보유하고 있고 제품을 개발하는 대부분의 제약회사들도 구조생물학에 근거한 신약개발 연구에 노력을 기울이고 있다. 우리나라의 경우 일부 대학과 연구소를 제외하고는 구조생물학 인력이 없는 형편이다.

앞으로, 다차원다핵종 NMR 기법과 RNA isotope labeling 기법의 발전, 그리고 극히 최근에 개발된 TROSY(transverse relaxation-optimized spectroscopy) 등은 200-300 nucleotide (60-100kD) 이상의 RNA 구조연구를 가능하게 할 것이며, structural building motif들의 개별적 구조연구를 종합함으로써 RNA 전체의 입체 구조가 얻어질 수 있을 것이다. 또한 최근의 RNA crystallization 방법이 많이 개발되었으므로 X-ray crystallography에 의한 구조도 계속 발표될 것으로 전망된다. NMR, X-ray crystallography와 더불어 low-resolution의 electron microscopy, neutron scattering, chemical modification & enzymatic digestion 실험, 등을 통하여 많은 거대 RNA 전체 구조와 RNA-protein complex 구조가 규명될 것으로 예상된다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 NMR 구조규명 기반기술

본 연구는 생체고분자의 입체구조를 규명하기 위한 최신 NMR 기법을 확립하고 RNA 등 생체고분자 입체구조를 실제로 규명하는데 목적이 있다. 1980년대에 NMR을 이용한 단백질 구조 규명 기법이 개발된 이후 NMR 기법은 급격한 발전을 거듭하여 최근 다차원다핵종 NMR 기법이 개발되어 단백질뿐만 아니라 RNA와 DNA의 구조까지도 규명할 수 있게 되었다. RNA는 공명선이 중첩되고 동위원소 치환 시료 합성이 어렵기 때문에 단백질에 비해 규명된 구조가 적다. 그러나 최근 새로운 기술이 개발되고 ribozyme 등이 알려짐에 따라 RNA에 대한 관심이 고조되어 많은 RNA 구조 연구가 전세계적으로 진행되고 있다.

본 절에서는 본 과제에서 구조를 규명할 때 사용한 최신의 다차원다핵종 NMR 기법을 기술하였다. 다차원다핵종 NMR 기법을 사용하기 위하여서는 동위원소로 치환한 생체분자의 합성이 필요한데, 동위원소 치환 RNA는 단백질에 비해 몇 단계 더 필요한 과정이 있다. UC Berkeley와 공동으로 개발한 동위원소 치환 RNA 시료 합성기술을 [1]에 기술하였다. [2]에서는 확립된 NMR 기법을 기술하였다. 상용의 NMR 기법과 최신의 다차원 NMR 기법을 기술하였다. 특히 RNA 구조 규명에 필요한 2차원 및 3차원 NMR 기법을 기술하였다. 또한 본 연구에서 개발된 새로운 NMR 기법인 pyrimidine-filtered pulse sequence도 자세히 기술하였다. [3]에서는 NMR data에 근거하여 3차원적 입체구조를 modeling하는 방법을 기술하였다.

본 연구에서는 새로운 NMR 기법 외에도 탄수화물 구조분석 기술과 DNA 사중나선 정량 기술을 개발하였다. 이 두 기술은 모두 국외 학술지에 발표되었다. 탄수화물 구조분석 기술은 [4]에, DNA 사중나선 정량 기술은 [5]에 기술하였다.

1. 동위원소 치환 RNA 시료 합성기술

NMR을 이용한 RNA의 3차원 입체구조를 규명에 있어서 가장 큰 걸림돌은 신호 겹침이다. 즉 분자량이 10K Da. 이상의 RNA일 경우 300개 이상의 proton nmr 신호가 10ppm 이내에 있기 때문에 신호 겹침이 많게 된다. 이러한 신호 겹침을 해소하기 위해서는 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 RNA 시료와 NMR 측정기법이 요구된다. 본 연구에서는 이에 필요한 동위원소 치환 RNA 시료의 합성기술을 확립하였다.

^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 RNA 시료를 합성하기 위해서는 몇 가지 단계가 필요하다. RNA는 template DNA와 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription 방법으로 합성한다. (Fig. 1-1 참조) DNA template는 automated DNA synthesizer를 이용하여 합성한다. 합성된 DNA는 PAGE 및 HPLC를 이용하여 분리하고 dialysis를 이용하여 정제한다. *In vitro* transcription에 이용되는 T7 RNA polymerase는 상업적으로 이용이 가능하지만 NMR sample 준비에 필요한 RNA의 large scale transcription에는 적당하지 않다. 따라서 T7 RNA polymerase gene을 가지고 있는 *E. coli*를 배양하여 분리, 정제하여 사용하였다. T7 RNA polymerase를 정제하는 방법은 여러 가지가 발표되었다. 본 연구에서는 fast-flow SP sepharose column을 이용하여 T7 RNA를 정제하여 사용하였고 이는 기존에 사용하던 P11 cation exchange column 방법을 대체하는 것으로 기존 방법에 비해 2배정도 효율적이다. Cell lysis 후 polymin P와 ammonium sulfate 침전법을 이용하여 polymerase를 1차 분리하고 SP sepharose column을 통과시켜 2차 분리시켰다. Polymin P를 이용한 침전법을 이용함으로써 DNA 및 RNA등의 핵산을 침전시킴으로서 column에서의 clogging 문제를 해결하고 protein의 순도를 높일 수 있었다. 또한 P11 cation exchange column을 이용한 정제 방법은 2주간의 실험기간이 필요하였으나 이번 연구 방법은 1주일만에 순도 높은 T7 RNA polymerase를 정제할 수 있었다. SP sepharose column으로 원하는 polymerase를 분리한 후 여러단계의 dialysis로 원하는 salt들과 nuclease들을 제거한후 냉동 보관하여 *in vitro* transcription에 정제된 polymerase를 이용하였다. Fig. 1-2에 정제된 T7 RNA polymerase의 SDS-PAGE 결과를 나타내었다.

In vitro transcription으로 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 RNA 시료를 합성하기 위해서는 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 NTP를 이용하여야 한다. 그러나 상용으로 나와 있는 label 된 NTP는 비용이 많이 소요된다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 NTP의 전구체인 NMP를 enzymatically phosphorylation 시켜서 사용하였다. 이 방법은 labeled NTP를 사용하는 방법에 비하여 4배 이상의 비용 절감 효과가 있다. ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 NMP mixture는 cambridge isotope로부터 구입하였다. Buffer solution에 NMP mixture와 kinase 및 PEP(phosphoenolpyruvate)를 가하고 overnight동안 incubation하여 반응을 시키고, 반응의 진행정도를 TLC 및 HPLC를 이용하여 관찰하였다. 반응이 끝나고 반응 mixture에서 합성된 ^{13}C 와 ^{15}N 으로

label 된 NTP를 boronate column을 이용하여 분리, 정제하였다. Column을 통과한 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 NTP를 동결건조 시켜 RNA 합성에 이용한다. 하지만 이렇게 준비된 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 label 된 NTP는 상용의 non-labeled NTP와 transcription의 조건이 많이 다르다. 특히 magnesium ion의 농도는 *in vitro* transcription의 수율에 많은 영향을 주었다. Labeled RNA를 합성하는데 transcription yield는 치명적인 영향을 주기 때문에 transcription 조건을 optimize하는 것이 필요하였다.

최적화된 합성조건을 이용하여 ^{13}C , ^{15}N 으로 치환된 RNA를 합성하였다. (Fig. 1-3 참조) 합성된 RNA는 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 분리하였고 electro elution, dialysis를 통해 정제하였다. 합성된 ^{13}C , ^{15}N 으로 치환된 RNA의 분리, 정제 조건은 non-labeled RNA와 같다. 본 연구에서는 ^{13}C , ^{15}N 으로 치환된 SL2 RNA (28 nucleotides)를 위와 같은 방법으로 준비하였다. ^{13}C , ^{15}N 으로 치환된 RNA는 Fig. 1-4와 같이 Proton- ^{13}C (또는 ^{15}N) HSQC NMR spectrum으로 확인되었다.

2. 다차원 다핵종 NMR 기술

NMR을 이용한 RNA의 3차원 구조 규명에는 여러 가지 NMR 측정기법들이 이용된다. 수용액 상태와 중수용액 상태에서의 1D 및 2D, 3D 등의 다차원 다핵종 NMR 기술이 요구된다. 수용액 상태에서는 exchangeable proton과 이와 상관관계를 가지는 핵종을 관찰하고, 중수용액 상태에서는 non-exchangeable proton과 ^{13}C , ^{15}N 그리고 ^{31}P 을 관찰하게 된다. 다음에 본 연구에서 적용된 상용기법의 NMR과 다차원 다핵종 NMR 기술을 서술하였다.

가. 상용기법

(1) DQF-COSY : 이 방법은 RNA가 one conformation을 가지는가를 확인하고 3-bond coupling에 의한 correlation을 측정하는데 이용한다. 모든 pyrimidine은 H6-H5 region (8-7ppm/6-5ppm)에서 하나의 crosspeak를 만들게 된다. 만약 이 숫자가 예상보다 많다면 multiple conformation을 가지거나 시료 준비과정에서 생기는 n+1에서 유래하는 경우이다. 이 경우에는 시료를 다시 정제하거나 시료조건 (온도, 농도, pH 등)을 달리하여 실험하여야 한다. 만약 이 숫자가 예상보다 적다면 H6-H5 crosspeak가 다른 region으로 shift 되어 있는가를 체크해 보아야 한다. 만일 intermediate exchange이거나 dynamic한 pyrimidine이 있을 경우 이 peak가 매우 약해 질 수 있다. 이 경우도 시료조건을 달리하여 실험해 볼 필요가 있다. 때때로 non-stem region의 pyrimidine은 매우 강하거나 매우 약한 crosspeak를 보여줄 수 있는데, 이는 dynamics에 의한 결과로 해석할 수 있다. RNA 구조에서 많은 경우 sugar는 C3'-endo conformation을 가지게 되는데, 이때 H1' to H2' coupling constant는 2 Hz 미만으로 COSY crosspeak를 보여주지 않는다. C2'-endo sugar는 강한 H1'-H2' (5-6ppm/4-5ppm) crosspeak가 나타나며 그 크기는 7 Hz를 넘기도 한다. RNA의 말단부위나 loop 부위의 경우 mixed sugar pucker를 가지기도 하는데, H1'-H2' region에서 약하게 보이는 crosspeak를 관찰 할 수 있다. H2'-H3'-H4'-H5'-H5'' proton사이에는 대부분의 경우 crosspeak를 관찰 할 수 있지만, RNA oligomer의 경우 신호겹침이 해석에 커다란 장애가 된다. Small sweep width, ^{31}P decoupled DQF-COSY 실험을 할 경우 peak pattern 분석을 통해 부분적 해석이 가능하다.

(2) TOCSY : Homonuclear TOCSY spectrum은 H1'과 H2' 사이의 J-coupling에 의한 연결이 가능한 C2'-endo sugar일 경우 유용하다. Crosspeak의 intensity는 얼마나 많은 transfer를 진행하는 가에 따라 달라진다. Mixing time이 길 경우 멀리까지(H4', H5', H5'') transfer가 가능하지만 그만큼 magnetization이 감소하게 되므로 여러 가지 mixing time에서의 실험이 필요하다.

(3) NOESY : 중수용액에서의 첫 번째 목표는 base proton (H8/H6, H5, H2)들과 H1'을 assign 하는 것이다. 이는 dipolar-coupling을 이용한 NOESY에서 base-sugar walk를 통해서 이루어진다. A-form helix에서는 H1'은 base proton (H8/H6)으로의 intranucleotide NOE 와 3' 방향으로 internucleotide NOE를 가진다. 만일 internucleotide NOE가 intensity가 틀리거나 관찰되지 않는다면 RNA conformation이 이 부위에서 달라졌다는 것을 알 수 있다. Pyrimidine의 H6 crosspeaks는 doublet으로 관찰되므로 singlet으로 관찰되는 purine H8으로부터 구별할 수 있다. H1'은 C2'-endo sugar가 아닐 경우 singlet으로 관찰되고, H1'-H5 region(6-5 ppm)에서 doublet으로 관찰되는 것은 COSY와 비교하여 C2'-endo sugar의 H1'인지 H5 crosspeak인지 구별한다. H5로부터의 crosspeak는 대부분 약하거나 관찰되지 않지만 관찰될 경우 방향성을 제공하기 때문에 유용하다. Adenine의 H2 proton은 nonexchangeable proton중에서 유일하게 inter-strand NOE를 보여주기 때문에 매우 중요하다. Adenine H2 proton은 long relaxation time을 이용한 실험이나 proton-carbon HMQC spectrum에서 쉽게 구별 가능하다. RNA의 stem region에서 A H2는 3개의 NOE를 나타내는데, 약한 H1'과의 intranucleotide NOE와 강한 internucleotide, interstrand NOE를 보여준다. 이외에 base-base, base-sugar, sugar-sugar NOE들을 assign하게 된다. Assign된 crosspeak는 3차원 구조 계산시에 volume integration을 통해 proton-proton distance restraint로 이용되게 된다.

나. 다차원 다핵종 NMR 기술

RNA 분자가 커지면 resonance peak가 많아지게 되고 신호겹침이 많아져서 peak assignment가 힘들어지게 된다. 이 경우에 ^{13}C , ^{15}N 을 이용한 다차원 NMR 기법들을 이용하면 peak overlap을 극복할 수 있게 된다. 따라서 ^{13}C , ^{15}N 으로 치환된 RNA를 합성하고 다차원 NMR 측정기법들이 필요하게 된다.

(1) HMQC/HSQC : 이 방법은 proton에 직접적으로 chemical bonding을 하고 있는 ^{13}C (또는 ^{15}N)을 관찰하는 방법이다. 이 spectrum에서 uridine C5 (100-105 ppm)은 cytidine C5 (95-100 ppm)에 비해 5-10 ppm 정도 downfield shift 되어 나타난다. 따라서 cytidine과 uridine을 구별함으로써 aromatic proton과 carbon을 assign 하는데 유용하다. Adenine C2 (150-160 ppm)은 purine C8과 pyrimidine C6 (135-145 ppm)으로부터 약 10 ppm downfield shift 되어 AH2의 위치를 쉽게 확인할 수 있다. C1' (85-95 ppm), C2'/C3' (70-79 ppm), C4' (80-87 ppm), C5' (60-69 ppm)은 proton에 비해 carbon의 chemical shift dispersion이 크므로 assignment에 도움이 된다. 특히 unusual conformation을 가진 RNA에서 proton에서의 shifted sugar peaks를 구별하는데 유용하다. Exchangeable proton의 경우 ^1H - ^{15}N

correlation 실험은 G imino (~150 ppm)과 U imino (~160 ppm) resonance를 구별하는데 유용하다. 마찬가지로 amino nitrogen(G ~70 ppm; A ~83 ppm; C ~95 ppm)의 경우에도 nitrogen이 다른 region에서 resonance를 보이므로 base에 따른 구별이 가능하다.

(2) HETCOR/HET-TOCSY/HET-TOCSY-NOESY : ^{31}P 의 chemical shift와 ^{31}P - ^1H coupling constant는 RNA의 backbone conformation에 대한 중요한 정보를 담고 있다. ^{31}P 을 이용한 heteronuclear COSY 실험은 ^{31}P 와 H3' 또는 H5'/H5" 사이의 3-bond coupling을 측정하는 방법으로 H3'의 assignment에 유용하게 사용될 수 있으며 coupling constant로부터 beta와 zeta의 dihedral angle에 대한 정보를 알 수 있다. Heteronuclear TOCSY 실험은 ^{31}P 와 H3'사이의 강한 coupling을 isotropic mixing을 이용하여 H2'/H4' 으로 연장시킴으로서 ^{31}P 에 대한 sequence-specific assignment를 수행할 수 있게 한다. 더 나아가서 heteronuclear-TOCSY-NOESY 실험으로 ^{31}P 에서 비교적 assignment가 쉬운 H1' 또는 base proton으로 magnetization을 transfer 함으로써 H1'/H8/H6/ ^{31}P 의 sequence specific assignment를 할 수 있다.

(3) HSQC-NOESY : ^{13}C 또는 ^{15}N 으로 label된 RNA 시료에서 proton에서 신호겹침이 나타난 경우의 NOE를 assignment에 유용한 실험이다. 2D와 3D로 실험할 수 있으며, homonuclear NOESY 실험에서 겹쳐진 신호를 ^{13}C 또는 ^{15}N 축으로 분리할 수 있기 때문에 매우 유용하다. 2D NOESY 실험에서 겹쳐진 H1'/H5에서 H2'/H3'/H4'/H5'/H5"으로의 NOE들은 ^{13}C HSQC-NOESY 실험에서는 C5 (95-105 ppm)와 C1'(85-95 ppm)의 chemical shift가 구별 가능하므로 NOE crosspeak의 겹침이 해소되어 assignments 및 NOE volume integration을 통한 구조분석에 유용한 정보를 제공한다. 3차원 구조 규명에 필수적인 base-sugar 사이의 NOE를 확인하는데 유용하게 사용된다.

(4) HCCH-COSY/HCCH-TOCSY/HCCH-Relay : RNA의 구조연구에서 가장 큰 걸림돌은 sugar의 resonance assignment이다. 그 이유는 대부분의 sugar proton들이 4-5 ppm사이에서 신호겹침이 심하기 때문인데, ^{13}C 에 의한 carbon chemical shift는 proton에 비하여 dispersion이 크다. 따라서 proton-carbon-carbon-proton으로의 magnetization transfer에 의한 HCCH 실험은 sugar assignment에 중요한 역할을 한다. 또한 ^1H - ^1H (~10 Hz) coupling constant에 비하여 ^1H - ^{13}C (~180 Hz), ^{13}C - ^{13}C (~40 Hz) coupling constant가 크므로 sugar pucker의 영향을 적게 받는다. HCCH-COSY에서는 DQF-COSY와 같은 정보를 얻게되나, sugar pucker에 의한 영향이 없으므로 일반적으로 관찰하기 어려웠던 H1'-H2' 등과 같은 correlation을 관찰할 수 있다. HCCH-Relay 실험으로는 H1'-H2', H1'-H4'의 correlation을 관찰한다. HCCH-TOCSY에서는 TOCSY와 같은 정보를 얻을 수 있으나 proton spread (~1 ppm)에 비하여 carbon spread (over 30 ppm)에 의한 영향으로 resonance를 쉽게 assign 할

수 있다.

다. 새로운 Pulse sequence 개발 : Pyrimidine-filtered pulse sequence

RNA의 구조연구에 있어서 첫 번째 과정은 spectral assignment를 하는 것이다. 이러한 assignment는 위에 서술된 상용 기법과 다차원 다핵종 NMR 기법을 이용하여 수행하고 있다. 특히 sequential base-H1', base-sugar의 crosspeak는 이러한 assignment를 하는데 있어서 가장 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 이 부위에서의 신호겹침은 RNA oligonucleotide, 특히 큰 분자일 경우의 assignment에 장애가 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 신호겹침을 해소하여 assignment를 수행할 수 있도록 하기 위하여 새로운 NMR pulse sequence를 개발하였다. Conventional NOESY spectra에서 pyrimidine H6 resonance를 포함하고 있는 NOE들을 selectively filter 하는 새로운 technique를 적용함으로써 spectrum을 simplify할 수 있었다. Fig. 1-5는 pyrimidine-filtered experiments의 pulse sequence를 나타내었다. 기본개념은 $90-\Delta-180-\Delta$ 의 excitation pulse 뒤에 pyrimidine의 H5를 selectively excite 하는 pulse를 가함으로써 pyrimidine의 H6 proton resonance을 selective하게 filter하는 것이다. 이때 $2\Delta = 1 / (2J_{H5-H6})$ 에 맞추어 pyrimidine의 antiphase로 나타나는 모든 single quantum을 multiple quantum으로 바꾸어 pyrimidine H6 resonance를 filter하였다. 결과적으로 나타나는 spectrum은 한 방향으로 selective filtration이 되고, 다른 한 방향으로는 nonselective excitation이 되므로 symmetry가 어긋난 spectrum을 얻게 된다. 이 pulse sequence를 SL2 RNA oligonucleotide에 적용한 것은 Fig. 1-6에 나타내었다. Fig. 1-6A는 standard NOESY experiment를, Fig. 1-6B는 pyrimidine-filtered experiment를 나타낸 것으로 standard NOESY experiment에서는 peak overlap 때문에 보이지 않았던 H8-H1' crosspeak들이 쉽게 관찰되었다. 본 연구에서 개발한 pulse sequence는 신호 감쇠가 T_2 에 의해 결정되는데, 그 크기는 $[1 - \exp(-2\Delta/T_2)]$ 이며 평균 52 %의 신호 감쇠가 관찰되었다. 이 pulse sequence는 많은 경우 관찰되는 purine과 pyrimidine의 base proton 또는 H1'과 H5의 resonance가 overlap 되는 경우에 유용하게 사용될 수 있다.

3. 생체분자 입체구조 모델링 기술

NMR을 이용한 생체분자 입체구조 모델링은 Fig. 1-7과 같은 과정을 거치게 된다. NMR spectra를 해석하여 resonance assignment를 수행하고 구조결정을 위한 constraint를 구한다. 구조계산에 필요한 initial structure는 model build, distance geometry(DG), simulated annealing(SA) 방법으로 구하고 iterative relaxation matrix approach(IRMA)와 같은 방법으로 refinement를 수행하게 된다. Final structure는 constraint와의 일치성, convergence, deviation from ideal structure등을 고려하여 구하게 된다. 다음에 본 연구에서 적용된 입체구조 모델링 기술을 서술한다.

가. Constraints

NMR을 통해서 얻은 정보는 구조계산에 필요한 기본 자료가 된다. 이러한 constraints는 interproton distance constraints, hydrogen bonding constraints, dihedral angle constraints등으로 나뉜다. Interproton distance constraints는 NOESY spectra의 crosspeak를 integration 함으로서 얻을 수 있는데, 이는 두 spin 사이의 magnetization transfer rate와 관련되면 NOE intensity는 interproton distance의 6승에 반비례하는 성질을 가진다. RNA 구조연구에서는 pyrimidine의 H5-H6 (2.45 Å) interproton distance를 기준으로 mixing time에 따른 NOE intensity를 비교하며 strong, medium, weak, very weak의 category로 나누고 각각에 해당하는 distance constraint로 바꾸어 준다. Exchangeable proton을 포함하는 distance constraint일 경우 exchange에 의한 영향을 고려하여 internucleotide NOE는 2-5 Å의 넓은 constraint를 준다. Hydrogen bond는 indirectly detection (imino and amino protons) 되는 경우와 directly detection (HNN-COSY) 되는 경우가 있다. Watson-Crick basepair에서는 NOE pattern에 따라서 hydrogen bond constraint를 donor와 acceptor사이의 distance constraint (2-3 Å)로 결정한다. Dihedral angle constraint는 ribose ring과 backbone angle에 대하여 적용 할 수 있다. 이에 대한 정보는 DQF-COSY, HETCOR 및 다차원 다핵종 NMR 기술등에서 결정할 수 있는데, ${}^3J_{H-H}$, ${}^3J_{H-P}$, ${}^3J_{H-C}$ 등을 측정하여 결정한다. DQF-COSY에서 ${}^3J_{H1'-H2'}$ 및 ${}^3J_{H3'-H4'}$ 은 sugar pucker를 결정하는데 중요한 역할을 한다. Backbone dihedral angle (from α to ζ)는 HETCOR, HCP 실험에서 결정할 수 있다. Dihedral angle β 는 ${}^3J_{H5'-P}$, ${}^3J_{H5'-P}$ 을 측정하여 결정하고, 이들이 모두 5 Hz 미만일 경우 trans ($180 \pm 40^\circ$)로 정한다. ${}^3J_{P-H3'}$ 이 5 Hz 이상일 경우 ϵ 의 경우 gauche'를 제외한 trans-gauch⁻ 범위로 정한다. ${}^3J_{H4'-H5'}$, ${}^3J_{H4'-5'}$ 이 모두 5 Hz 미만일 경우 ν 는 gauche'로 결정된다. 하지만 이 두 coupling constant는 DQF-COSY에서는 신호검침으로 인하여 결정하기 어려우므로 NOESY의 crosspeak로부터 qualitative하게 결정

한다. Phosphorous chemical shift는 α 와 ζ 의 dihedral angle에 따라 민감하다. 보통의 A-form RNA의 경우 ^{31}P 는 -3.5에서 -4.5 ppm 사이에서 resonance를 보이고 이로부터 upfield 또는 downfield shift된 phosphorous resonance의 경우 unusual dihedral angle을 가질것으로 예상할 수 있다.

나. Distance Geometry

이 방법은 point들 사이의 거리에 바탕을 둔 geometric problem을 연구하는 것으로 N 개의 atom이 있을 때 $N(N-1)/2$ 개의 interatomic distance가 생기게 되고 atom i, j 가 있을 때 element (i, j) 를 가진 $N \times N$ matrix로 represent 한다. NMR data로부터 얻은 geometric information을 이용하여 molecular model을 construction 하는 초기 방법으로 이용된다. Distance geometry는 interatomic distance의 upper and lower bound로 된 matrix을 계산하고, 각각에 대한 bounds 내의 trial interatomic distance value로 assign 하는 과정과, distance matrix을 cartesia coordiante로 바꾸고, target lower and upper bounds로 refine 하는 과정을 거치게 된다. 첫 번째 과정에서는 trianlge smoothing을 하고, embedding을 통해 cartesian coordinate를 만들게 된다. 만들어진 cartesian coordiante는 simulated annealing과정을 통해 upper bound와 lower bound로 refine하여 molecular dynamic등에 필요한 initial structure를 제공하게 된다.

다. Iterative relaxation matrix approach

IRMA는 보통 불완전한 NMR data set와 model structure (DG, SA등을 통한 initial structure)로부터 NMR relaxation theory를 적용하여 refine된 NOE distance list를 만들어주는 computational 방법중의 하나이다. RNA내에서의 dipolar interaction들은 molecule 내의 다양한 motion에의해서 modulation 된다. 따라서 NOESY spectra에서 얻어지는 crosspeak의 intensity는 spin diffusion effects, molecular flexibility, spin-relaxation phenomenon등의 조합으로 이루어진다. 이렇게 측정된 NOE와 J coupling은 structural parameter로 번역된다. IRMA는 관찰된 NOE intensity로부터 molecular flexibility를 고려한 entire spin-relaxation network를 계산하여 보다 정확한 NOE값을 표현할 수 있다. 첫 번째 step에서는 starting 또는 model structure의 atomic coordinate로부터 associateed NOE relaxation matrix를 계산하고, 다음 step에서 theoretical NOE intensity를 계산하게 된다. 측정된 NOE crosspeak intensity로부터 experimental NOE intensity matrix를 계산하고, 두 개의 matrix를 합쳐서 relaxation matrix로 back-transform한다. 이 average된 relaxation matrix로부터 upper 와 lower distance matrix를 계산하고, refine된 distance restraint set을 만들게 된다.

이렇게 구현된 set을 restrained molecular dynamics 방법으로 improve 된 structure를 계산한다. 이 과정에서 IRMA는 NMR restraints를 순차적으로 refine 하게 되고, refine된 구조를 만들게 된다. 이러한 cyclic 과정은 convergence가 이루어질 때까지 반복된다.

4. 탄수화물 구조분석 기술

가. 서론

β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan은 인간의 면역시스템을 증진하고 자극하는 특성을 가지고 있어 생체반응 변경자(Biological Response Modifiers : BRMs)라고 불린다.(Kulicke, 1997; Kiho, 1991; Blascheck, 1992; Kitamura, 1994; Bohn & BeMiller, 1995) 다른 구조를 갖는 β -glucan의 다양성은 다양한 원료와 추출과정에서 그 원인을 찾을 수 있다.(Bohn & BeMiller, 1995; Kollar, 1997) 미세 기관(microorganism)에서 추출한 β -glucan들은 일반적으로 β -D-(1 \rightarrow 3)-연결 무수당 단위(anhydrous glucose units : AGUs)를 뼈대로 갖고 주기적으로 β -D-(1 \rightarrow 6)으로 연결되는 결사슬을 갖는다. 하지만 가지 없이 똑바른 β -D-(1 \rightarrow 3)-연결의 glucan들도 있다. 지금까지의 수많은 연구결과로(Williams, 1991; Williams, 1992; Suzuki, 1991) 보면 가지화 정도(Degree of Branching)와 화학적 변화에 따라 β -glucan의 분자량(MW)과 수용액에 대한 용해도가 결정되는데, 이러한 점이 BRM으로 임상적으로 사용될 수 있는지를 결정 할 때 중요하게 작용한다. 임상적으로 유용한 glucan의 분자량 범위는 100KD-200KD이고 가지화 정도(DB)는 0.2-0.5이다.(Bohn & BeMiller, 1995)

β -glucan의 분자구조, 중합정도(Degree of Polymerization : DP), 그리고 DB는 파괴적이거나 비파괴적인 방법으로 분석해왔다. β -glucan의 글라이코시딕 연결과 DB는 메틸화 분석법과 특이효소분해법, ^{13}C NMR 방법으로 분석할 수 있다. 효소분해법은 DNA 또는 단백질 같은 생체고분자 분석에 사용하는 것보다는 그리 폭넓게 사용되지는 않는다. 그 이유는 모든 β -glucan이 효소로는 잘 분해되지도 않고 또 분해 후 분리하는 방법도 어렵기 때문이다.(Kitamura, 1994; Stahmann, 1995; Stahmann, 1993) ^{13}C NMR 분석법은 대략적으로 글라이코시딕 연결과 DB를 결정할 수 있지만 분석 시 많은 양의 시료가 필요하고 신호대 잡음비도 낮은 문제가 있다.(Jamás, 1990) 메틸화 분석은 글라이코시딕 연결 결정에 사용되어 왔지만 많은 시간과 전처리에 주의를 요하고 더구나 같은 β -glucan 시료의 경우에도 많은 경우 재현성이 없는 문제가 있다.(Bohn & BeMiller, 1995; Waeghe, 1983; Hakomori, 1964) Read 연구팀(Read & Currie, 1996)에서는 EI-Mass를 이용하여 수용액에 녹는 laminarin의 구조를 분석했지만 이러한 방법은 분석하고자 하는 물질의 MW에 제한이 있고 BRM 활성이 없는 DP가 30 보다 작은 glucan의 경우에만 적용할 수 있다.

그 동안 NMR 스펙트럼의 복잡함과 분자의 응집문제 때문에 큰 β -D-(1 \rightarrow 3)-glucan의 분자구조는 ^1H -NMR을 이용하여 분석할 수 없었다.(Williams, 1991) β -D-(1 \rightarrow 3)-연결을 갖는 몇몇의 이당류의 아노머 수소를 ^1H , ^{13}C NMR분석으로 확인할 수 있었다.(Jansson, 1988; Ensley, 1994) 보다 최근에, Ensley 연구팀(Ensley, 1994)에서 수용액에 녹지 않는 효모 glucan의 내부수소들을 이차원 NMR로

확인하였고, 이것은 β -D-(1→3)-연결에 대한 결정적인 증거를 제공하는 것이었다. 박테리아에서 추출한 다당류의 다른 AGU의 다양한 아노머수소들은 ^1H NMR 분광법으로 측정이 가능하다. (Duenas-Chasco, 1988) 지금까지는 ^1H NMR 분광법으로 정량적인 분석이 불가능 했지만 Gidley(1985)가 복잡한 ^1H NMR 스펙트럼을 가지는 다당류와 전분의 DP와 DB를 측정할 가능성을 처음으로 제시하였다. 하지만 다른 AGU들의 다양한 H-1들은 알아낼 수 없었고, 다당류의 경우 해상도가 떨어지기 때문에 올리고당의 경우에만 DP를 계산할 수 있었다.

지금까지는 β -glucan들의 구분이 가능한 다른 AGU들의 매우 작은 피크들을 완전히 해석하는 것은 불가능했다. 이런 매우 작은 피크를 확인할 수 있어야만 ^1H NMR 스펙트럼으로 DB와 DP를 결정할 수 있다. 매우 작은 피크들은 환원말단수소-1(RT), 비환원말단수소-1(NRT), 환원말단의 바로 이웃하는 두 번째 AGU의 수소-1(SRT), 결사슬에서의 말단 AGU의 수소-1(TSC), 결사슬(SC)의 말단 AGU를 제외한 모든 AGU들의 수소-1, 등이다. (Fig. 1-8 참조) 여기에서 우리는 BRM 특성을 가지는 β -D-(1→3, 1→6)-glucan 류들의 구조적 특성을 ^1H NMR 분광법을 사용하여 결정하였고, 다양한 AGU들의 1번 수소들을 완벽하게 확인하였다. 또한 ^1H NMR 분광법으로 간단하고 비파괴적으로 DPn값 540인 pachyman 정도의 분자량인 β -D-(1→3, 1→6)-glucan의 DPn과 DP의 결정하는 방법을 제시하였다.

나. 방법

(1) 재료 : Table 1-1은 본 연구에서 사용한 다양한 β -D-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucan들의 관용명, 물성, 분리 출처를 요약하고 있다. Laminaribiose, laminaripentaose와 laminariheptaose는 Seikagaku Co. (Tokyo, Japan)에서 구입했으며, gentiobiose와 laminarin은 Sigma Chemical Co. (MO, USA)에서, pustulan과 pachyman은 Calbiochem Co. (CA, USA)로부터 각각 구입했다. 동결건조한 yeast glucan은 이전에 보고된 방법으로 준비하였다. (Williams, 1991; Williams, 1992; Williams, 1994; Lowman, 1998; Muller, 1997; Pretus, 1991)

(2) 환원과정 : Laminaripentaose와 laminariheptaose는 NaBH_4 (3mg/1ml)을 사용하여 1M NH_4OH 용액 상에서 환원시켰다. 이 과정은 말단기를 글루시톨기로 환원시킨다. 환원된 생성물은 에탄올 침전 과정과 10분 동안 3000RPM에서 원심분리 단계를 거쳐 분리했다. 마지막으로, 중성화에 따른 부산물로 생성된 봉산은 메탄올에 의한 반복되는 증류 과정을 통해 제거하였다. NMR 분석을 위해 환원된 생성물들을 50~60°C에서 휘저으면서 혼합 용매(DMSO-d_6 : D_2O = 6:1)에 녹였으며, 잔류하는 NaBH_4 는 원심분리에 의해 제거하였다.

(3) NMR spectroscopy : 모든 NMR 실험은 수소 원자에 대해 600.13MHz로 공명하는 Bruker FT-NMR 분광기 DMX600에서 수행하였다. 시료들은 DMSO-d_6 또는 DMSO-d_6 와 D_2O 의 혼합 용매(6:1)에 녹였다. 시료들의 농도는 ^1H 실험을 위해서 1ml 당 5mg의 glucan을, ^{13}C 실험을 위해 1ml 당 20mg의 glucan을 녹였으며, 80°C의 온도에서 실험을 수행하였다. ^1H 에서 공명선의 chemical shift에 대한 내부 표준 물질로서 tetramethylsilane(TMS, 0ppm)를 사용하였으며, ^{13}C 에 대해서는 DMSO-d_6 (39.5ppm)를 사용하였다. ^1H 실험에서, 복소수 데이터 저장을 위해 32K 크기의 기억 장소를 사용하였으며 30° 펄스를 사용하여 얻어진 128개의 FID들을 평균화하였다. 획득한 FID들 사이에 5초의 반복 지연 시간을 두었다. 이 FID들은 64K로 zero filling 하였고, Fourier 변환 전에 지수 함수를 적용하였다. ^{13}C 실험에 대해서는 64K의 크기의 기억 장소를 사용하였으며 30° 펄스를 사용하여, 반복 지연 시간이 5초로 정해진 2048~4096개의 FID들이 평균화하였다. ^1H 와 ^{13}C 의 공명선 지정을 위해 2 차원의 magnitude COrrelation SpectroscopY(COSY)와 Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy(HMQC)실험을 하였다. COSY 실험은 2048(t2)×256(t1) 크기의 복소수 데이터 저장과 이완 지연 시간을 1.5초로 정하여, 16 개의 FID를 평균화하였다. FID들은 t1에 대해 1024로 zero filling하였고, 두 차원에 대해 squared sinebell 함수를 적용하였다. HMQC 실험은 2048(t2)×256(t1) 크기의 복소수 데이터로, 이완 지연 시간을 2초로 정하여, 16~128 개의 FID를 평균화하였다. FID들은 t1에 대해 1024로 zero filling 하였고, 각각의 차원에 대해 9

0° 위상이 이동한 squared sinebell 함수를 적용하였다.

(4) NMR 용매의 선택 : 어떤 β -glucan들은 수용액 상에서 3차원적 구조상의 배열이 변화 할 수 있다. β -(1→3,1→6)-D-glucan의 ^{13}C NMR 분석을 위해 분자들 간의 응집(분자들의 운동성 감소)을 방지할 수 있는 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 사용하였다. 또한 DMSO는 D_2O 나 NaOD와 같은 수용액 용매 보다 신호의 분해능을 좋게 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 종종 아노머를 구분 할 수 있게 하는 위치의 수소 피크와 OH 피크가 중첩하여 결과를 정량적으로 분석하기 어렵다. 그래서 이와 같은 OH 피크를 제거하기 위해 DMSO-d6와 D_2O 가 혼합된 용매를 사용하였다. 이 용매조건은 다당류(polysaccharide)의 분자 운동성을 증가시키기도 한다.

다. 결과

(1) 표준 물질을 사용한 골격의 ^1H 피크 지정 : 내부의 기간 골격을 이루는 AGU들의 H-2, H-3, H-4, H-5와 H-6의 피크 지정은 다른 AUG들에서 각각의 수소가 동일한 진동수에서 공명하기 때문에 쉽게 확인할 수 있었다. 이들은 COSY와 HMQC 스펙트럼들 그리고 이전에 수행한 피크 지정에 대한 보고들을 참고하여 쉽게 피크를 지정 할 수 있었다. H-1 수소들을 제외한 이들 수소의 피크 지정에 대해서는 여기서는 생략하기로 한다.

Gentiobiose에서 환원 말단기(RT)의 α -H-1과 β -H-1 피크는 각각 4.96ppm(d, $J=3.7\text{Hz}$)과 4.34ppm(d, $J=7.9\text{Hz}$)에 위치했다. 환원 말단기에서 두 번째에 위치한 AGU (SRT)의 H-1의 피크는 RT의 두 가지 아노머 형태로 인하여 4.23~4.26ppm에서 두 개의 이중선으로 나타난다. COSY와 HMQC 스펙트럼에서 H-2와 C-1과 이루는 각각의 짝지음 상수 그리고 그들의 피크 적분 값들의 결과는 이와 같은 피크 지정이 확실함을 뒷받침 해 주었다.(Fig. 1-9)

Laminaripentaose와 laminariheptaose에는 6 개의 H-1 피크가 4.41~5.04ppm 사이에서 이중선으로 나타났다. RT의 α -와 β -H-1 수소들은 각각 5.03ppm(d, $J=3.6\text{Hz}$)와 4.43ppm(d, $J=7.7\text{Hz}$)으로 확인하였다. H2 수소와의 짝지음, 피크 적분 그리고 C-1과의 연관관계(α -C-1에 대해서는 91.46ppm, β -C-1에 대해서는 96.10ppm)는 위와 같은 H-1의 피크 지정을 확실하게 하였다.(Fig. 1-10 & Fig. 1-11) 4.57ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$)에서 공명하는 가장 강한 피크는 기간 골격(BC)에서 내부의 H-1 수소로 지정했다. 4.50~4.53ppm에 위치하는 삼중선 같이 보이는 피크는 사실상 SRT의 두 개의 피크가 중첩된 것이다. 이곳은 위에서 언급한 laminaribiose와 gentiobiose의 경우에는 동일한 이유로 인해 두 개의 피크로 분리된다. 이와 같은 피크 지정은 두 번째 AGU의 두 이중선이 단일한 이중선(4.50ppm, d, $J=7.8\text{Hz}$)으로 합쳐지는 환원된 laminaripentaose의 스펙트럼에서 확인할 수 있었다. 여기서 유지되는 이중선(4.46ppm, d, $J=7.8\text{Hz}$)은 환원되지 않은 말단 AGU(NRT)의 H-1으로 지정하였다. OH기 수소의 피크 지정을 위해 DMSO를 용매로 사용하였다. Laminariheptaose의 COSY 스펙트럼에서 6.19와 6.47ppm의 피크가 RT의 α -와 β -H-1과 짝지어져 있기 때문에 각각 RT의 α -와 β -OH-1으로 지정하였다. OH-2, OH-4와 OH-6의 수소피크 역시 위 과정에서 보는 바와 같이 그들과 대응되는 비교환성 수소의 피크와의 연관 관계로부터 지정하였다.(Fig. 1-10) 이들 신호들의 피크 지정은 측정된 chemical shift가 실험 온도와 사용한 용매에 따라 약간의 차이가 생길 수 있음을 고려한다면 이전에 보고된 결과들과 잘 일치하였다.

아노머 수소가 없는 환원된 laminaripentaose에서는 개개 AGU들의 H-1 피크들이 잘 분리되었고, 적분결과로 하나의 수소임을 알 수 있었다. 이 chemical shift를 근거로 NRT의 H-1은 4.45ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$), SRT의 H-1은 4.50ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$), 내부의 H-1은 4.55ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$)과 4.48ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$)으로 각각 지정하였다.

환원된 laminariheptaose (스펙트럼 생략)에 대해서는 내부의 H-1이 두 개의 이중선(4.57ppm, 4.56ppm)으로 보여지는데, 피크의 면적 비는 3:1 이었다. 이는 4.57ppm의 피크가 4, 5, 6 번째 AGU들의 H-1 임을 말하며, 4.56ppm 위치의 피크는 3 번째 AGU의 H-1 임을 나타낸다.

(2) Laminarin과 pustulan의 결 사슬 1H 피크 지정 : 결 사슬에서의 H-1의 피크 지정을 위해, *Laminaria digita*에서 추출한 laminarin은 좋은 표준 물질로서 사용하였다. Laminarin에서 결 사슬들은 β -1 \rightarrow 6로, 기간 골격은 β -1 \rightarrow 3의 형태로 연결되어 있다. (Usui, 1979; Stone & Clarke, 1992) 주 사슬의 ^{13}C NMR 분석은 이전에 보고되어진 바가 있다. Laminarin은 두 개의 다른 말단기로 구성된다. 하나는 말단이 mannitol 기로 끝이 나고(M-series), 다른 하나는 환원된 glucosyl기로 끝이 나며(G-series), 이들은 약 3:1의 비율로 존재한다. Laminarin은 평균 DP_n 가 20~30으로 분산하기 때문에 모든 분자들이 동일한 DP_n 를 가지지 않고, 또한 결 사슬의 glucosyl기들은 불균질하다.

Fig. 1-9G와 Table 1-2에서 보는바와 같이, 기간 골격의 AGU (RT, NRT, SRT와 내부의 AGU)의 H-1 피크 들은 oligolaminarin들의 chemical shift를 비교하거나, COSY와 HMQC 스펙트럼을 분석하여 용이하게 지정할 수 있다. M-series에서 mannitol 옆에 있는 SRT의 H-1은, NRT H-1(4.46ppm)와 중첩하고, 4.47ppm(d, $J=7.8\text{Hz}$)에서 나타났다. 결 사슬의 β -6 \rightarrow 1로 연결되어진 H-1은 C-1(105.34ppm)과 연관 관계가 보이는 4.28(d, $J=7.7\text{Hz}$)과 4.34ppm(d, $J=7.7\text{Hz}$)에서 나타난다. 이와 같은 chemical shift들은 gentiobiose 와 pustulan에서 β -1 \rightarrow 6로 연결되어진 H-1의 chemical shift와 대응된다. 4.28ppm에서의 피크는 모든 β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucan에서 보여진다. 그러나 4.34ppm 위치에 나타나는 피크는 결 사슬이 하나 이상의 glycosyl 기를 갖는 laminarin의 경우에만 나타난다. 이와 같은 관찰과 그들의 chemical shift에 근거하여 4.28ppm에서의 피크는 결 사슬의 분기된 단일 또는 말단 AGU(TSC)의 H-1으로 지정하였으며, 4.34ppm에서의 피크는 결 사슬 안의 말단 AGU를 제외한 모든 AGU들(SC)의 H-1으로 지정하였다.

결 사슬에서 SC의 용량은 결 사슬 안의 기간 골격의 분기점으로부터 β -6 \rightarrow 1 형태로 연결된 H-1에 대한 피크 적분을 통해 20%($\pm 1\%$)로 계산되어졌다. 그러나 이 결과가 결 사슬 안의 glucosyl기 수를 나타내는 것은 아니지만, 4.34ppm에서의 피크와 그것의 용량은 laminarin을 구성하는 분자들의 다분산과 불균질성에 대한 결정적 증거를 제공한다.

(3) 표준 물질의 DP_n 와 DB 결정 : 확인한 H-1의 피크 적분으로 β -glucan들의 DP_n 와 DB는 다음의 식을 이용하여 계산할 수 있다.

$$\text{DP}_n = \text{모든 H-1 피크 면적} / \text{RT H-1피크 면적}, \text{ 또는} \quad (\text{A})$$

$$= \text{모든 H-1 피크 면적} / \text{NRT H-1 피크 면적} \quad (A')$$

$$DB = \text{TSC H-1 피크 면적} / \text{골격의 모든 H-1 피크 면적} \quad (B)$$

Laminaripentaose와 laminariheptaose에서, (A)와 (A')으로부터 계산된 DP_n 은 각각 5 와 7로 매우 유사한 값이다.(Table 1-3) 특히 Laminariheptaose의 DP_n 은, 비록 S/N 비율이 ^1H NMR 스펙트럼 보다 낮기는 하지만, RT, NRT, SRT와 내부의 C-1가 분명하게 구분되어 ^{13}C 피크로부터 계산할 수 있었다.(Fig. 1-10) 이와 같은 ^{13}C 피크의 면적 비는 대략 1:1:1:4이며, 이는 ^1H NMR 분석의 경우처럼 DP_n 값이 7이다. 그러나 ^{13}C NMR 분석은 oligosaccharide의 경우에만 가능했다.

식(A')을 이용하여 계산한 laminarin의 DP_n 은 33이다. 이는 HISEC-MALLS-RI로 측정된 절대적 $DP_w(37)$ 와 크게 다르지 않다. DP_w/DP_n 의 비율로 표현된 분산성을 고려하면, 두 가지의 측정치는 완벽하게 일치한다. 식(B)를 이용하여 계산한 laminarin의 DB는 0.07이며, 이는 이전에 EMSI 분석을 이용하여 보고된 결과 (0.06)와 약간 다르다. M-series와 G-series의 비율은 일부 H-1 피크들의 중첩으로 인하여 계산하지 못했다.

(4) β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan의 구조분석

(가) Yeast glucan : 물에 녹지않는 Yeast glucan의 chemical shift는 HMQC와 DQF-COSY 스펙트럼에서 확인한 laminarin과 laminarioligomer의 chemical shift를 기초로 하여 확인하였다.(Fig. 1-12A & Table 1-2) 모든 거대분자의 경우 SRT의 수소-1의 피크가 내부의 AGU들의 수소피크와 겹친다. 최근의 연구에서(Williams, 1994) yeast glucan의 분산은 1.12로 밝혀졌다. 무게평균분자량이 3.5×10^4 으로 알려졌는데 이는 DP_n 219와 같은 것이다. 하지만 대부분의 연구자들은 그 값이 상대적으로 작기 때문에 DB 값은 무시하여왔다. 우리가 yeast glucan의 DP_n 값을 NMR로 분석했을 때 MALLS 분석결과와 동일한 218의 값을 얻었다. 그리고 DB는 0.003 그리고 $\alpha:\beta$ 의 비는 1:1.01(Table 1-2)로 측정되었다. 측정된 $\alpha:\beta$ 비와 DB값은 지금까지 다른 방법들로는 측정치 못한 것을 ^1H -NMR 분석법으로 가능하게 함을 증명하는 것이다. β -D-(1 \rightarrow 3)-glucan들의 물에 대한 용해도는 생체활성이 있는지를 결정하는 가장 중요한 특성이고, 이것은 DB 값에 의해 결정된다. 지금까지는 인산화와 황화같은 화학적 변형으로 물에대한 용해도를 증가시켜 생체활성을 유도했다. 물에 잘 녹지 않는 yeast glucan과는 대조적으로 인산화된 glucan은 임상적으로 유용하게 사용된다.(Muller, 1996) 인산화-yeast glucan의 ^1H -NMR 분석에서 DP_n 값은 210인데 비해 이전에 발표된 값은 137-450정도로 다양하다. 그 이유로는 정제단계에서 인산화-yeast glucan이 응집하기 때문으로 알려져 있다. 우리의 결과는 인산화 하지 않은 yeast glucan의 DP_n 값(218)과 유사했고, 인산화된 yeast glucan의 DB는 0.02였다. 이처럼 물에 녹거나, 녹지 않는 yeast glucan의 DB값이 일치하지

않는 것은 yeast glucan을 분리할 때 처음 과정이 다르기 때문이다. 같은 원료를 가지고 실험할 시에도 다양한 DB값을 갖는 것으로 이전에 이미 보고되었다.

Loman(1998)은 비공유결합을 하는 인산기가 인산화-yeast glucan의 helix 가운데에 위치하여 용매시스템의 pH를 변화시키는 것으로 제안하였다. 우리는 시료를 녹인 후에 용매의 pH를 측정하지는 않았지만 인산화-yeast glucan의 chemical shift를 비교했을 때 yeast glucan과 같았다.

(나) Curdlan과 Pachyman : Curdlan과 pachyman은 물에 녹지 않는다. Pachyman은 고체상태에서는 curdlan과 물리화학적으로 구조적으로 유사하지만 DP값은 아주 크고 겔가지 사슬은 적다.(Fig. 1-12 & Table 104)(Okuyama, 1996; Nakata, 1998) DMSO와 D₂O의 비를 6:1로 한 혼합용매 조건에서 curdlan의 DPn값은 163이었고, 용매혼합비를 9:1로 하면 DPn 값이 225로 증가하였다. 이런 불일치성은 용해도의 변화와 물의 양에 따른 구조의 변화, 그리고 curdlan이 분산의 특성을 가지고 있기 때문이다.(Suda, 1995; Zhang, 1995) Curdlan은 DMSO 용매에 매우 높은 용해도를 갖는다. Curdlan의 α -, β -H1의 비와 DB는 각각 1:1.25과 0이다. Pachyman의 DPn과 DP는 540과 0.003이고, 지금까지 우리가 NMR 분석법으로 연구하고 발표한 β -D-glucan 가운데 가장 큰 DPn값을 가진다.

5. DNA 사중나선 정량 기술

가. DNA 사중나선의 중요성

CpG oligodeoxynucleotide(ODN)는 innate와 adaptive immunity를 activating시킬 수 있는 물질로 알려져 있다.(Klinman, 1999a; Carpentier, 1999; Klinmann, 1999b; Walker, 1999; Kovarik, 1999, Kline, 1998) CpG ODN의 endosome으로의 entry는 immunostimulatory 기능에 매우 중요한 것으로 보인다.(Yi, 1998; Hacker, 1998) DNA가 포유류의 세포막에 binding하는 것은 알려져 있지만, 아직 receptor는 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 dG run이라 불리는(Pisetsky, 1996) consecutive dG residue를 CpG ODN에 붙임으로써 immunostimulatory 기능을 향상시킨다는 사실을 발견하였다.(Lee, 2000) 구체적으로, CpG ODN의 3'-말단에 dG run을 붙일 경우 mouse splenic dendritic cell에서 TNF- α 와 IL-12가 상당히 증가하는 것을 관측하였다.(Lee, 2000) 최적의 dG 길이는 6개인 것으로 밝혀졌다. 반면, 5'-말단에 dG run을 붙일 경우 오히려 cytokine induction을 감소시키는 결과가 관측되었다. 본 연구에서 합성하여 cytokine production을 측정된 sequence는 Table 1-5에 보고하였다. 또한 위치에 따른 영향은 Table 1-6에서 보여주었다.

나. dG run의 구조 및 정량화

dG run의 위치에 따라 cytokine induction이 달라진다는 것은 dG run의 위치에 따라 사중나선 구조의 형성 여부가 결정되는 것인가에 대한 의문점을 제기한다. 아니면, 사중나선이 위치와 관계없이 형성이 되는데 다른 기작에 의하여 induction이 달라질 수도 있다. 이 점을 밝히기 위하여 본 연구에서 NMR을 사용하여 사중나선 구조의 population을 측정하는 정량방법을 개발하였다.

dG run이 scavenger receptor (SR) activity를 방해한다는 것은 이미 보고된 바 있다.(Pearson, 1993) 본 연구에서는 여러 길이의 dG run과 dG run이 부착되는 위치가 어떻게 activity에 영향을 미치는가를 파악하기 위하여 NMR spectrum을 이용하였다. 사중나선은 10-12 ppm에 공명을 일으키는 imino proton peak를 보여준다.(Aboul-ela, 1994; Cheong & Moore, 1992) 반면 Watson-Crick base pair는 12-15 ppm에 imino proton이 공명을 일으킨다. 따라서 두 영역의 imino proton 공명선의 peak integration 값을 비교하면 사중나선 구조와 Watson-Crick base pair를 하는 hairpin 혹은 duplex 구조의 population 비를 구할 수 있다.(Fig. 1-13) 본 연구에서 cytokine induction에 사용된 여러 ODN에 대하여 G-quartet 구조와 Watson-Crick 구조의 비를 계산하여 Fig. 1-13에 보여주었다. 4개 혹은 그 이상의 dG residue를 가진 ODN은 모두 위치에 관계없이 사중나선 구조를 형성하였다. dG

run이 길수록 사중나선의 population은 증가하였다. 3'-말단에 위치한 dG run의 경우 5'-말단보다 더 효과적으로 사중나선이 형성됨이 관측되었다. 이것은, 3'-말단의 dG ODN이 5'-말단의 dG ODN보다 cellular binding이 더 효과적이라는 실험 결과와 일치한다.

6. 참고 문헌

- Aboul-ela, F. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 243, 458
- Adachi, Y. et al. (1990) *Carbohydr. Res.* 198, 111-122
- Allain, F.H. & Varani, G. (1995) *J. Mol. Biol.* 250, 333-353
- Aspinall, G.O. (1982) *The Polysaccharides Vol. I*, Academic Press, New York, p 148-152
- Batey, R.T. et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20, 1547-1551
- Blascheck, W., Kasbauer, J., Kraus, J. & Granz, G. (1992) *Carbohydr. Res.* 231, 293-307
- Bohn, J.A. & BeMiller, J. (1995) *Carbohydr. Polymer* 28, 3-14
- Brodsky, A.S. & Williamson, J.R. (1997) *J. Mol. Biol.* 267, 624-639
- Can, K. (1966) *J. Chem.* 44, 540
- Carpentier, A.F. et al. (1999) *Cancer Res.* 59, 5429
- Chandley, W., Browder, W., Lowman, D. & Williams, D. (1997) *Carbohydr. Res.* 299, 203-208
- Cheong, C. & Moore, P.B. (1992) *Biochemistry* 31, 8406
- Cheong, C., Varani, G. & Tinoco, I., Jr. (1990) *Nature* 346, 680-682
- Cheong, H.-K., Cheong, C. & Choi, B.S. (1996) *Nucl. Acids Res.* 24, 4197-4201
- Cheong, H.-K., Seong, B.L., Choi, B.-S. & Cheong, C. (1999) *Nucl. Acids Res.* 27, 1392-1397
- Cianci, C., Tiley, L. & Krystal, M. (1995) *J. Virol.* 69, 3995-3999
- Collin, P.M. & Ferrier, R.J. (1995) *Monosaccharides*, John Wiley & Sons Ltd, New York, p.534
- Ensley, H.E., Tobias, B., Pretus, H.A., McName, R., Jones, E., Williams, B.I. & Williams, D. (1994) *Carbohydr. Res.* 258, 307-301
- Fodor, E., Pritlove, D.C. & Brownlee, G.G. (1994) *J. Virol.* 68, 4092-96
- Fodor, E., Pritlove, D.C. & Brownlee, G.G. (1995) *J. Virol.* 69, 4012-19
- Gdaniec, Z., Sierzputowska-Gracz, H. & Theil, E.C. (1998) *Biochemistry* 37, 1505-1512
- Gidley, M. (1985) *Carbohydr. Res.* 139, 85-93
- Hacker, H. et al. (1998) *EMBO J.* 17, 6230
- Hagen, M., Chung, T.D.Y., Butcher, J.A. & Krystal, M. (1994) *J. Virol.* 68, 1509-1515
- Hakomori, S. (1964) *J. Biochem.* 55, 205-208
- Hong, J., Kim, D.-G., Yoo, J.S. & Cheong, C. (1999) *Microchemical Journal* 63, 109-118

- Hong, J. et al. (2000a) *Microchemical Journal* in press "Damaged Products of Cytosine in Hydroxyl Radical Solution under UV-irradiation"
- Hong, J. et al. (2000b) *Analytical Sciences* 16, 621-626
- Jamas, S., Chen, Y-C.J., von der Osten, C.H., Sinskey, A.J. & Rha, C.K. (1990) *Carbohydr. Polymer* 13, 207-219
- Jansson, P., Kenne, L. & Schweda, E. (1988) *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2729-2736
- Kay, L.E. et al. (1993) *J. Magn. Reson. B* 101, 333-337
- Kiho, T., Sakushima, M., Wang, W., Nagai, K. & Ukai, S. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* 39, 798-800
- Kim, Y.T. et al. (2000) *Carbohydrate Research* 328, 331-341
- Kitamura, S., Hori, T., Kurita, K., Takeo, K., Hara, C., Itoh, W., Tabata, K., Elgsaeter, A. & Stokke, B. (1994) *Carbohydr. Res.* 263, 112-121
- Kline, J.N. et al. (1998) *J. Immunol.* 160, 2555
- Klinman, D.M. et al. (1999a) *Immunity* 11, 123
- Klinman, D.M., Conover, J. & Coban, C. (1999b) *Infect. Immun.* 67, 5658
- Kollar, R., Reinhold, B., Petrakova, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. & Cabib, E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17762-17775
- Kovarik, J. et al. (1999) *J. Immunol.* 162, 1611
- Kulicke, W., Lettau, A.I. & Thielking, H. (1997) *Carbohydr. Res.* 297, 135-143
- Lamb, R.A. & Choppin, P.W. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 32, 467-506
- Lee, S.W. et al. (2000) *J. Immunology* 165, 3631-9
- Lowman, D., Williams, D. & Ensley, H. (1998) *Carbohydr. Res.* 306, 559-562
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Pavin, J.D. & Palese, P. (1989) *Cell* 59, 1107-1113
- McIntire, T. & Brant, D. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6909-6919
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. & Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 8783-98
- Muller, A. et al. (1996) *The journal of immunology* 156, 3418-3425
- Nakata, M., Kawaguchi, T., Kodama, Y. & Konno, A. (1998) *Polymer* 39, 1475-1481
- Okuyama, K., Obata, Y., Noguchi, K., Kusaba, T. & Ito, Y. (1996) *Biopolymers* 38, 557-566
- Pearson, A.M., Rich, A. & Krieger, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 3546
- Peter Stahmann, K., Ludwig Schimz, K. & Sahn, H. (1993) *J. General Microbiology* 139, 2833-2840

- Pisetsky, D.S. (1996) *Immunity* 5, 303
- Poon, L.L.M., Pritlove, D.C., Sharps, J. & Brown, G.G. (1998) *J. Virol.* 72, 8214-19
- Pritlove, D.C., Poon, L.L.M., Fodor, E., Sharps, J. & Brown, G.G. (1998) *J. Virol.* 72, 1280-86
- Read, S. M., Currie, G. & Bacic, A. (1996) *Carbohydr. Res.* 281, 187-201
- Richtering, W., Fuchs, T. & Burchard, W. (1998) *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 102, 1660-1664
- Saito, H. & Yokoi, M. (1989) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62, 392-398
- Saito, H., Yoshioka, Y, Yolo, M. & Yamada, J. (1990) *Biopolymers* 29, 1689-1698
- Seong, B.L. & Brownlee, G.G. (1992a) *J. Gen. Virol.* 111, 3115-3124
- Seong, B.L. & Brownlee, G.G. (1992b) *Virology* 186, 247-260
- Stahmann, K., Monschau, N., Sahm, H., Koschel, A., Gawronski, M., Conrad, H., Springer, T. & Kopp, F. (1995) *Carbohydr. Res.* 266, 115-128
- Stone, B.A. & Clarke, A.E. (1992) *Chemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans*, La Trobe University, Australia, p.1-803
- Suda, M., Ohno, N., Adachi, Y. & Yadomae, T. (1995) *Carbohydr. Res.* 270, 107-113
- Suzuki, T., Ohno, N., Adachi, Y., Cirelli, A., Covian, J. & Yadomae, T. (1991) *J. Pharmacobio-Dyn.* 14, 256-266
- Teresa Duenas-Chasco, M., Rodriguez-Carvajal, M., Tejero-Mateo, P., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A. & Gil-Serrano, A. (1998) *Carbohydr. Res.* 307, 125-133
- Usui, T., Toriyama, T. & Mizuno, T. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, 43, 603-611
- Usui, T., Yokoyama, M., Yamoka, N., Matsuda, K. & Tuzimura, K. (1974) *Carbohydr. Res.* 33, 105-116
- Varani, G., Cheong, C. & Tinoco, I., Jr. (1991) *Biochemistry* 30, 3280-89
- Waeghe, T., Darvill, A., McNeil, M. & Albersheim, P. (1983) *Carbohydr. Res.* 123, 281-304
- Walker, P.S. et al. (1999) *PNAS* 96, 6970
- Williams, D., McNamee, R., Jones, E., Preus, H., Ensley, H., Browder, W. & DiLuzio, N. (1991) *Carbohydr. Res.* 219, 203-213
- Williams, D., McNamee, R., Preus, H., Ensley, H. & Browder, W. (1992) *Carbohydr. Res.* 235, 247-257
- Williams, D., Pretus, H. & William Browder, I. (1992) *J. liquid. Chromatography* 15, 2297-2309

- Williams, D. (1991) *J. Pharmacol. & Exptl. Therap.* 257, 500-510
- Williams, D., Mcnamee, R., Preus, H., Ensley, H. & Browder, W. (1994)
Carbohydr. Res. 253, 293-298
- Yi, A.K. et al. (1998) *J. Immunol.* 160, 4755
- Zhang, L., Yang, L. & Chen, J. (1995) *Carbohydr. Res.* 276, p. 443-447
- Zhang, L., Ding, Q., Zhang, P., Ahu, R. & Zhou, Y. (1997) *Carbohydr. Res.*
303, 193-197

Table 1-1. Structural characteristics and solubility of standard compounds and β -D-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucans examined in this study

Trivial Name	Linear or branched	Solubility in water	Solubility in DMSO	Solubility in alkali	Poly-dispersity	Sources
Laminaribiose	linear	Soluble	Soluble	Soluble	-	-
Gentiobiose	linear	Soluble	Soluble	Soluble	-	-
Laminari-pentaose	linear	Soluble	Soluble	Soluble	-	-
Laminari-heptaose	linear	Soluble	Soluble	Soluble	-	-
Laminarin	branched	Soluble	Soluble	Soluble	1.18 [#]	<i>Laminaria digita</i>
Pustulan	linear	Soluble	Soluble	Soluble	*	<i>Umbiliaria papulosa</i>
Yeast glucan	branched	Insoluble	Soluble	Soluble	1.12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Glucan phosphate	branched	Soluble	Soluble	Soluble	1.67~6.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Curdlan	linear	Insoluble	Soluble	Soluble	*	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Pachyman	branched	Insoluble	Partial soluble	Partial soluble	*	<i>Poria cocos</i>
Sleroglucan	branched	Soluble	Soluble	Soluble	1.83	<i>Sclerotium glucanicum</i>

[#]Result from our measurement.

*Values given by the manufacturer.

*Unknown.

Table 1-2. ¹H-NMR chemical shifts(ppm) and coupling constants(Hz) of anomeric protons at different AGUs of standard compounds and β-D-(1→3,1→6)-glucans in the mixed solvents(DMSO-d₆:D₂O = 6:1) at 80°C

Compound	RT		SRT	BC	NRT	SCT	SC
	α	β					
Gentiobiose	4.96(3.7)	4.34(7.9)	4.25(7.9) 4.23(7.9)	-	-	-	-
Laminaribiose	5.03(3.7)	4.39(7.8)	4.42(7.9) 4.41(7.9)	-	-	-	-
Laminari- pentaose	5.03(3.6)	4.43(7.8)	4.51(7.8) 4.50(7.8)	4.57(7.8)	4.46(7.8)	4.45(7.8)	-
Reduced laminaripentaose	*	*	4.45(7.8)	4.57(7.8) 4.54(7.8)	4.46(7.8)	-	-
Laminari- heptaose	5.03(3.6)	4.43(7.6)	4.52(7.8) 4.50(7.8)	4.57(7.8)	4.46(7.8)	-	-
Reduced laminariheptaose	*	*	4.49(7.8)	4.56(7.8) 4.57(7.8)	4.47(7.8)	-	-
Laminarin	5.03(3.6)	4.43(7.7)	4.52(7.8) 4.51(7.8)	4.57(7.8)	4.46(*)	4.28(7.7)	4.34(7.7)
Yeast glucan	5.02(3.6)	4.42(7.8)	4.53 [#]	4.57(7.6)	4.46(7.8)	4.26(10.6)	-
Glucan phosphate	5.02(*)	4.42(*)	4.53 [#]	4.57(7.6)	4.46(7.8)	4.27(7.6)	-
Curdlan	5.02(3.7)	4.42(7.8)	4.52 [#]	4.57(7.6)	4.46(7.8)	4.27(7.8)	-
Pachyman	5.03(4.0)	4.42(*)	4.51 [#]	4.57(7.7)	4.45(7.9)	4.27(7.8)	-
Scleroglucan	5.02(*)	4.42(*)	completely overlapped	4.59~4.56	4.45(*)	4.28(7.7)	-
Pustulan	*	*	*	4.32(7.8)	*	*	*

*Undetectable value.

[#]Slightly overlapped value with that of internal H-1 at main chain unit.

Table 1-3. ^{13}C NMR chemical shifts of a series of β -D-(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) glucan in DMSO- d_6 at 80°C

Compound	unit	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Laminari-heptaose		102.81	72.39	86.01	68.16	75.94	60.59
	α^1	91.46					
	β^1	96.10					
Laminarin		105.34	76.04	87.36	71.03	78.50	63.63
Yeast glucan		104.62	74.23	88.09	69.93	78.05	62.46
Yeast glucan phospahte		104.73	74.63	87.90	70.23	78.15	62.95
Scleroglucan	A ²	- ³	74.14	88.22	70.01	78.05	62.56
	B ²	104.60	74.14	88.00	69.98	76.48	70.01
	C ²	- ³	74.33	88.37	70.31	78.05	62.46
	D ²	- ³	75.29	78.37	71.94	77.87	62.83

¹ α and β mean the configuration of reducing terminal C1 units.

²A, B, C, and D mean glucose units (Fig. 1-8 참조).

³Overlapped signal.

Table 1-4. The calculated value for the characteristics of various β -glucans by using the relative ratio of anomeric protons at different AGUs in mixed solvent at 80°C

compound	$\alpha : \beta$ ratio	DB		DP	
		Our study	Other study	Our study	Other study
Laminaribiose	1 : 1.01	0	0	2	2
Gentiobiose	1 : 1.46	0	0	2	2
Laminari-pentaose	1 : 1.09	0	0	5	5
Laminari-heptaose	1 : 1.03	0	0	7	7
Laminarin	*	0.07	0.05	33	20~30
Yeast glucan	1 : 1.02	0.003	*	218	220
Yeast glucan phosphate	*	0.02	0.04	210	137~450
Curdlan	1 : 1.25	0	0	225	< 540
Pachyman	*	0.003	0.015~0.02	540	255~690
Scleroglucan	*	0.33	0.33	-	9700

¹Values given by the manufacturer.

*Undetectable.

Errors are below 1%.

Table 1-5. The effects of dG run on cytokine induction from splenic dendritic cells ^a

ODNs	sequences	cytokine production ^b			
		IL-12 (ng/ml)		TNF- α (pg/ml)	
LPS		1.59	0.25	844	154
Media		0.07	0.01	27	4
p#9	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GGGGCG	1.32	0.31	640	96
p#9d	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u>	0.07	0.01	25	3
M#1	GGAAAAGCTTCTTCGGGGCG	0.05	0.01	27	3
M#7	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GCCCCG	0.09	0.02	30	3
M#3	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GGGCCG	0.07	0.01	20	1
M#4	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GGCCCCG	0.05	0.01	22	2
M#5	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GGCGCG	0.08	0.02	36	5
M#6	GGAAA <u>ACGTTCTTC</u> GGGGGG	2.40	0.77	960	166
M#9	GGGGAA <u>ACGTTCTTC</u> GCCC	0.13	0.05	39	6
M#26	GGGGGGAA <u>ACGTTCTTC</u> GCG	0.13	0.07	96	26
M#27	GGGGGGGGAA <u>ACGTTCTTC</u>	0.07	0.03	64	19

^a C57BL/6 mouse splenic DCs (10^5 cells/well) were stimulated by various ODNs (1.5 μ M) or LPS (0.5 μ g/ml) for either 10 h (TNF- α) or 30 h (IL-12). ^b Mouse TNF- α and IL-12 were measured from culture supernatants by ELISA kits. Numerical values represent mean and SEM of quadruplicate. Consensus CpG motifs are underlined. The experiments were repeated five times with similar results.

Table 1-6. The effects of a dG run on cytokine induction depend upon its location ^a

ODNs	sequences	cytokine production ^b					
		IL-12 (ng/ml)		TNF- α (pg/ml)		IL-12 (ng/ml) ^c	
1826D	TC ATGACG TTCCTG ACG TT	0.37	0.07	134	58	4.15	1.17
M21 \pm	TCCAT GACG TTCCTG ACG TTGGGGG	3.04	0.57	1103	176	8.11	2.19
M20 \pm	GGGGG TCCATGACG TTCCTG ACG TT	0.42	0.11	115	29	1.74	0.57
M12 \pm	\pm CTT AACG TTCT	0.05	0.01	18	3	1.68	0.33
M22 \pm	\pm TT AACG TTCTGGGGG	0.88	0.17	408	55	7.89	3.21
M23 \pm	\pm GGGGG CTTAACG TTCT	0.05	0.01	40	5	0.86	0.25
M16 \pm	GG AAAACG TTCTCGGGGG	2.40	0.77	960	166	4.76	1.65
M16A \pm	GG AAAACG TTCTCAAAAA	0.05	0.01	25	2	5.56	1.10
M16E \pm	GG AAAACG TTCTCTTTTT	0.06	0.01	29	3	5.11	0.88
M16C \pm	GG AAAACG TTCTCCCCC	0.06	0.01	45	8	4.35	0.52
M16G \pm	GG AAAACG TTCTCGGGGG	0.08	0.02	31	2	0.15	0.03

^a C57BL/6 mouse splenic DCs (10^5 cells/well) were stimulated by various ODNs (1.5 μ M) for either 10 h (TNF- α) or 30 h (IL-12). ^b Mouse TNF- α and IL-12 were measured from culture supernatants by ELISA. Numerical values represent mean and SEM of quadruplicate. ^c ODNs (0.3 μ M) were delivered with liposome (3 μ g). The 24 h-supernatants were tested for IL-12. Consensus CpG motifs are underlined and nucleotide runs are shown by bold letters. All the experiments were repeated three times with similar results.

T7 RNA polymerase

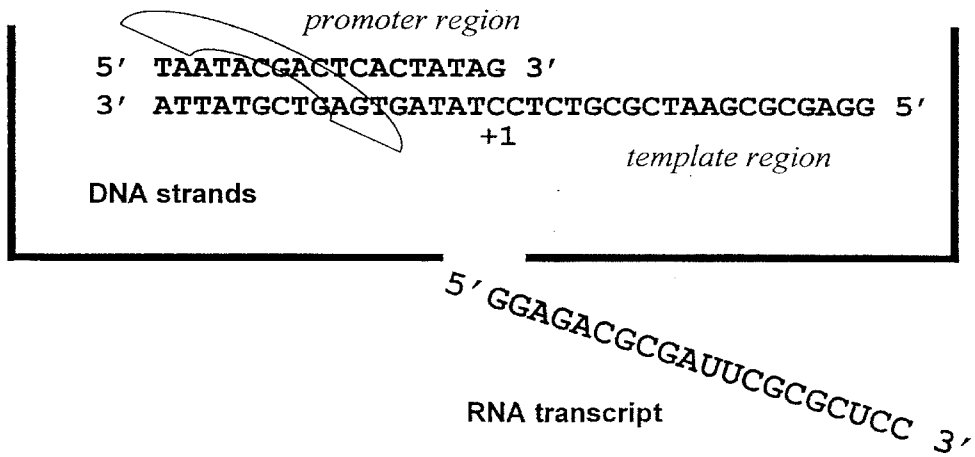


Fig. 1-1. T7 RNA polymerase를 이용한 in vitro transcription

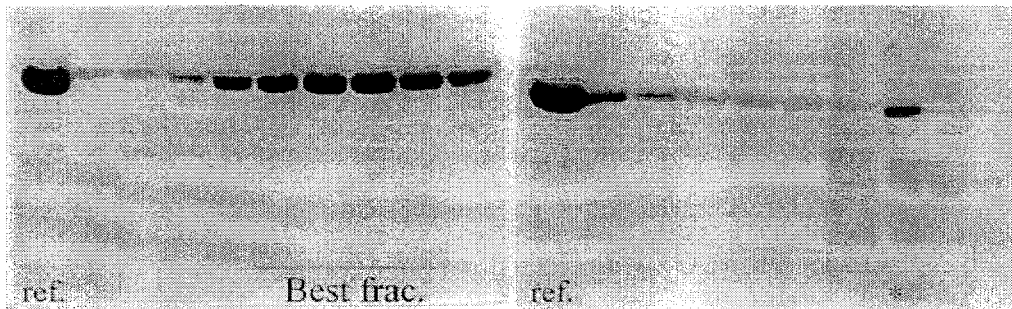


Fig. 1-2. 정제된 T7 RNA polymerase의 8 % SDS-PAGE
Best fraction 만을 dialysis 하였다.

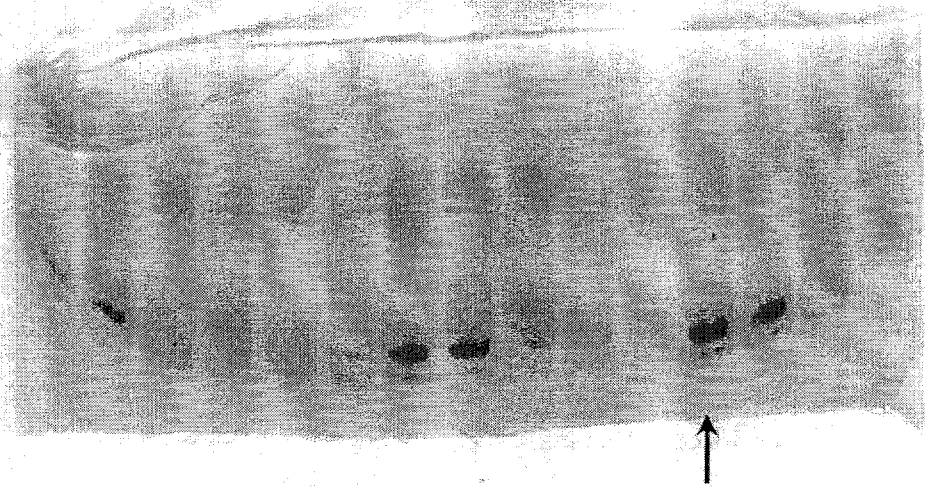


Fig. 1-3. In vitro transcription의 최적화 pH, NTP, enzyme, magnesium 농도 등의 조건을 결정. 화살표로 최적화된 조건을 나타내었다.

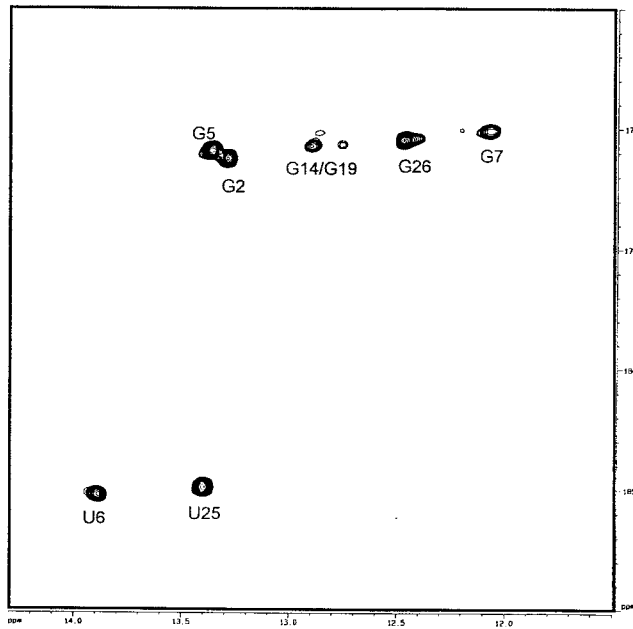


Fig. 1-4. ^{13}C , ^{15}N doubly labeled SL2 RNA 의 HSQC spectrum G와 U의 imino peak들이 nitrogen dimension에서 구별된다.

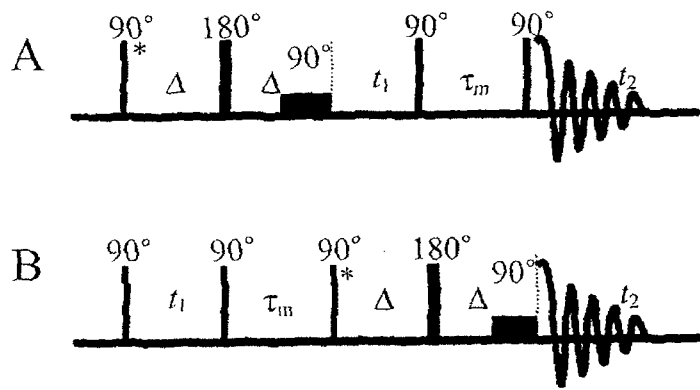


Fig. 1-5. Pyrimidine-filtered experiments의 pulse sequences

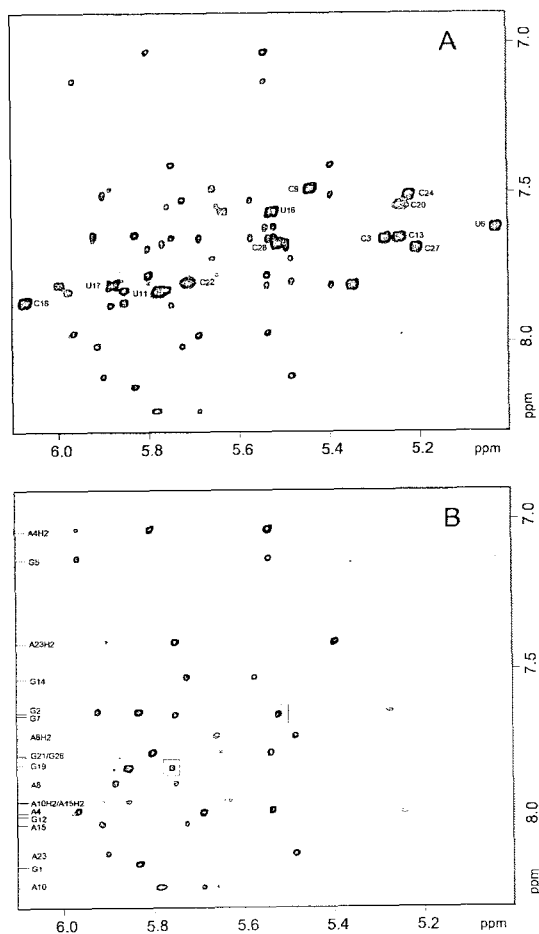


Fig. 1-6. SL2 RNA의 standard NOESY spectrum (A)와 pyrimidine-filtered NOESY spectrum (B)

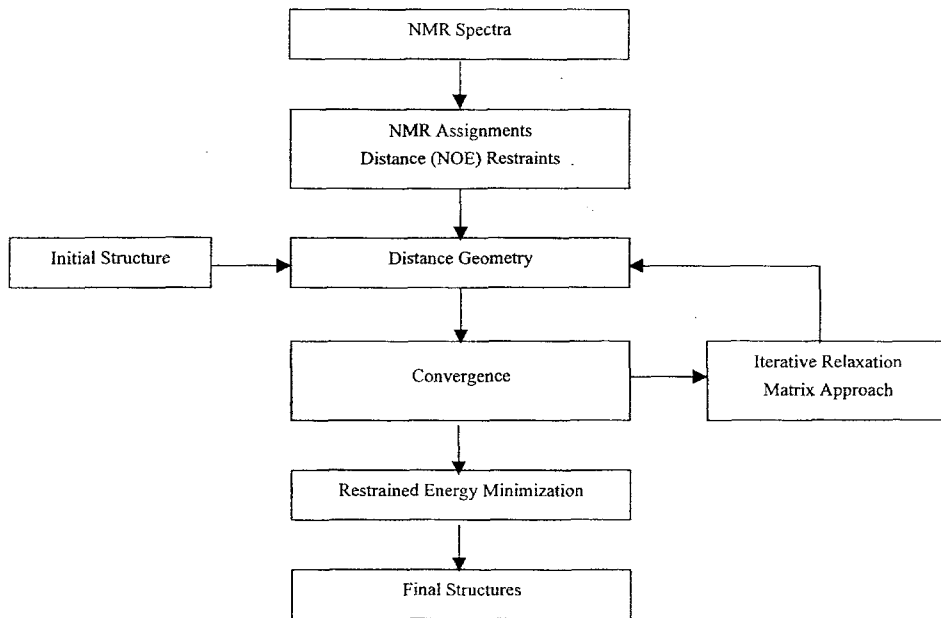


Fig. 1-7. NMR을 이용한 RNA의 3차원 구조 결정 방법

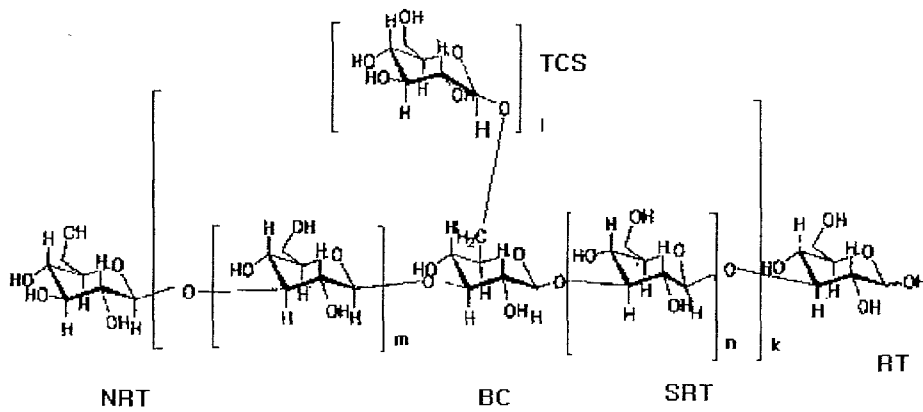


Fig. 1-8. Structure of β -glucans and abbreviations of AGUs

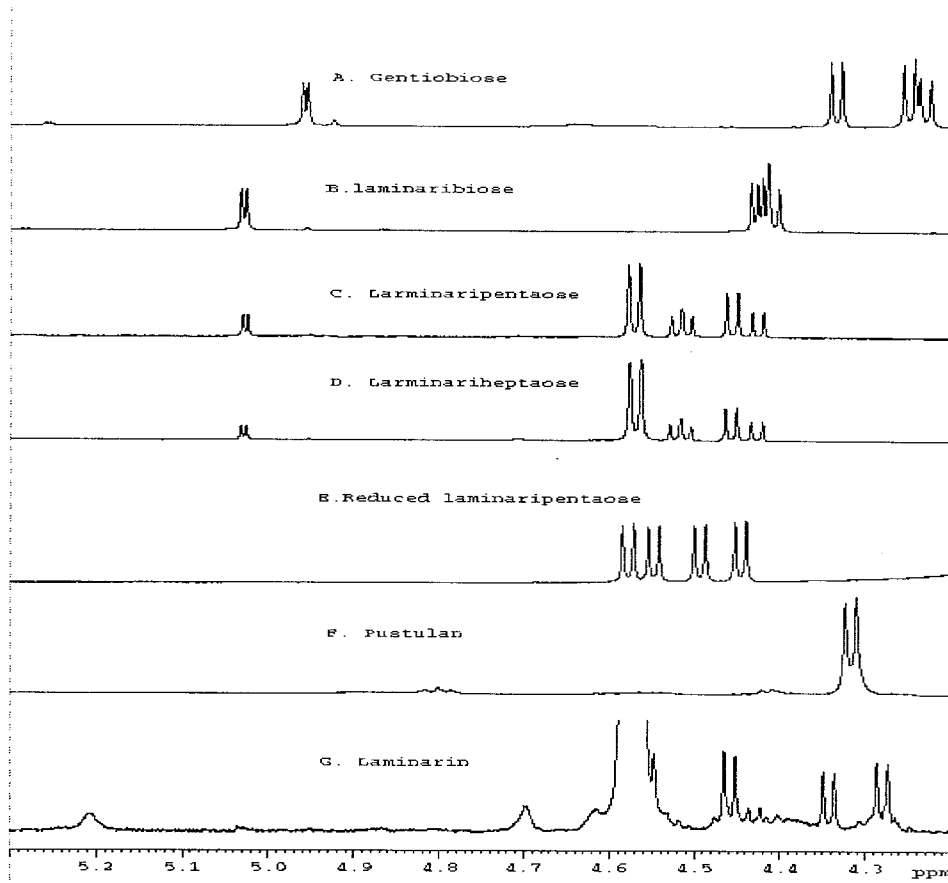


Fig. 1-9. ^1H -NMR spectrum of standard Glucan

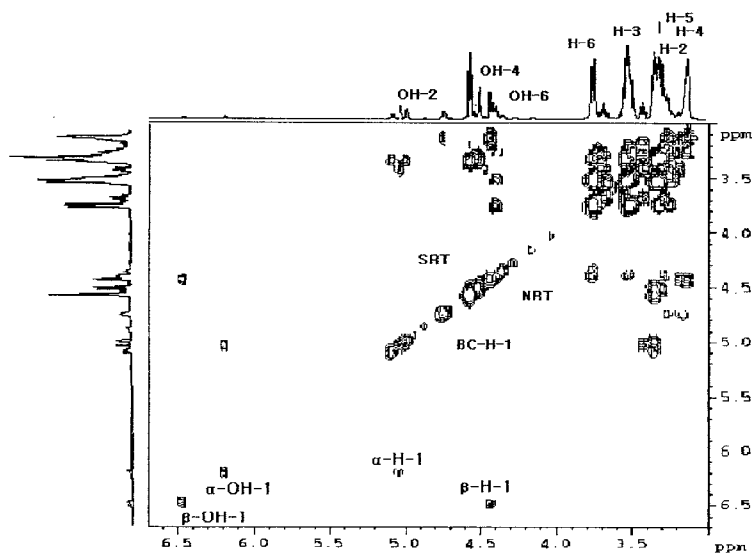


Fig. 1-10. COSY spectrum of Laminariheptaose

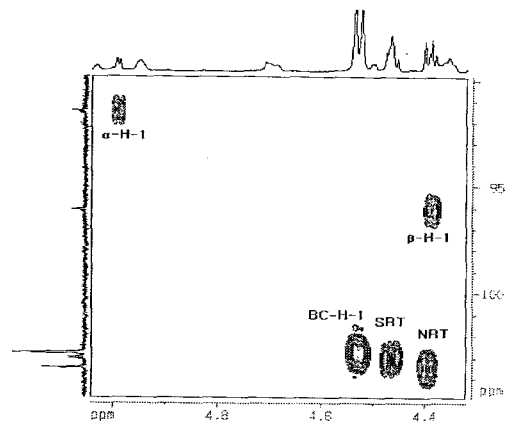


Fig. 1-11. HMQC spectrum of Laminariheptaose

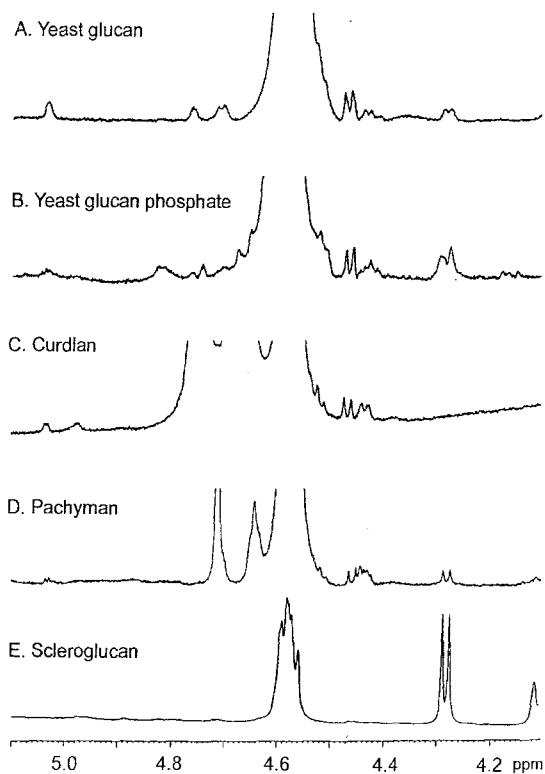


Fig. 1-12. ^1H -NMR spectrum of polyglucans

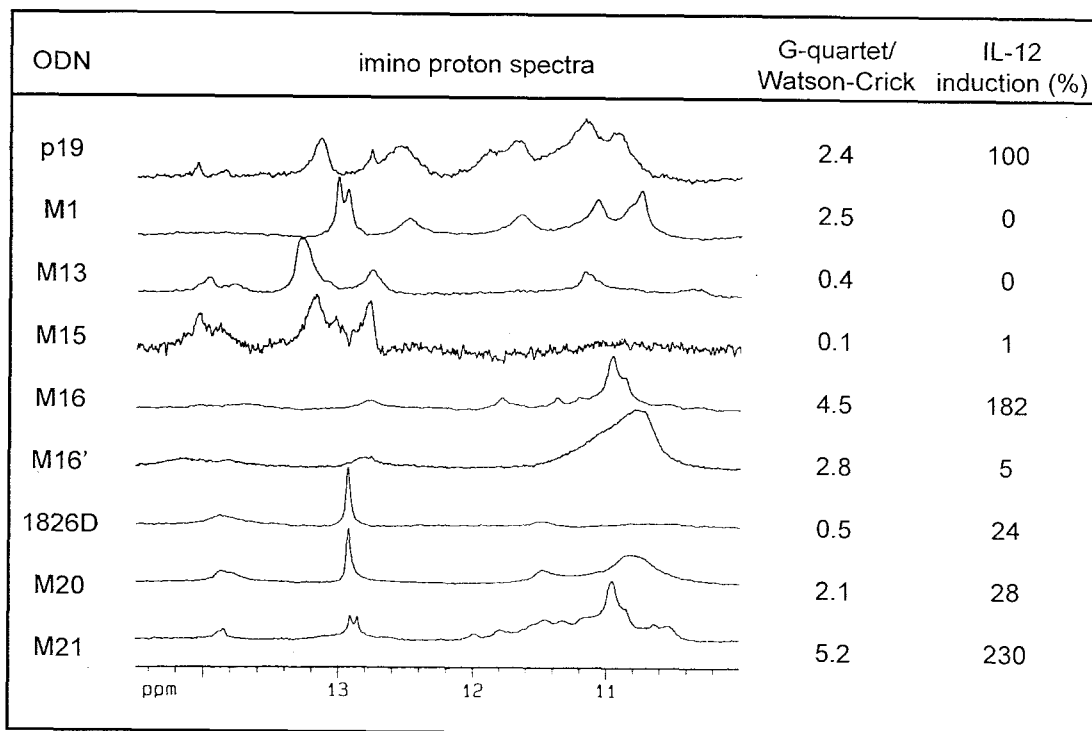


Fig. 1-13. Imino proton NMR spectra and the population ratios of tetraplex structure for various ODNs. The population ratios of tetraplex structure to hairpin or duplex structure were estimated by calculating the peak integral ratios of G quartet imino proton resonances and Watson-Crick base-paired imino proton resonances at 10-12 and 12-14.5 ppm, respectively. The relative percentages of IL-12 induction from splenic DCs were also reported by setting the IL-12 induction by p19 as 100%. The nucleotide sequence of M16' is GGGGGGAAAACGTTTCGTC.

제2절 손상된 DNA 구조 규명

1. AA Mismatch DNA 구조

가. 서론

최근에 많은 연구가 수행되고 있는 생체 물질들인 핵산이나 단백질의 구조결정에 있어서 핵자기공명분광법은 액체 상태에서의 구조를 분석하기 때문에 결정구조보다 더 실제에 가까운 구조를 알 수 있다는 장점이 있다. 주로 공간에서 두 핵간의 거리를 신호의 세기를 통해서 알려주는 NOESY 기법과 서로 화학적 결합을 통하여 짝지움하고 있는 핵간의 짝지움상수를 통해서 그들간의 이면각(dihedral angle)에 대한 정보를 주는 COSY 기법, 또 이중핵간의 짝지움 정보를 주는 HMQC와 HMBC 기법들이 구조결정법에 많이 쓰인다.

이러한 핵자기공명분광법의 결과들을 집어넣어 3차원적인 분자모델을 그리는 작업들이 또한 많이 수행되어져 왔는데, IRMA (iterative relaxation matrix analysis), DG (distance geometry), EM (energy minimization), 그리고 MD (molecular dynamics) 등의 방법들을 각각 혹은 여러 가지 방법들을 병행하여서 수행한다.

본 연구는 대옥시리보핵산의 수용액상태에서의 구조를 밝히기 위하여 수행되었는데, 불일치 염기쌍을 포함하고 있는 핵산의 구조에 관심을 갖고 살펴보았다. 불일치 염기쌍은, 비록 핵산이 비록 이중나선구조로 되어있어서 염기가 잘 변형되지 않지만, 생체내에서 핵산을 복제하거나 재결합할 때 생길 수 있으며, 이러한 잘못된 염기쌍들은 리보핵산으로 전사할 때 잘못된 리보핵산을 만들고 다시 잘못된 단백질을 합성하게 되므로 반드시 고쳐야 한다. 고침효소는 잘못된 염기를 인식하여 작용하게 되는데, 그 효율이 불일치 염기쌍의 종류(Kramer, 1984)와 그 이웃한 염기서열(Fazakerley, 1986)에 따라서 달라진다.

Escherichia coli(Kramer, 1984)에서 고침효율은 불일치 염기쌍에 따라 다른데, A-C, G-G, G-T의 경우가 가장 좋고, 그 다음이 A-A의 염기쌍이며, A-G, C-C, C-T, T-T의 경우가 가장 나쁘다. 또, 티노코와 그의 공동 연구자들(Aboul-ela, 1985)은 올리고 핵산에서 여러 가지 종류의 불일치 염기쌍을 도입하여 각각의 열역학적 안정성을 검사하였다. 그 결과 실온에서 가장 안정한 불일치 염기쌍은 G-T, G-G, G-A 처럼 구아닌을 갖는다고 보고하였으며 가장 불안정한 것은 C-A, C-C 처럼 사이토신을 갖는다고 보고하였다. 이것은 열역학적 안정성이 고침효율과 꼭 상관하지는 않다는 것을 말해준다. 일반적으로는 호모퓨린이 호모피리미딘보다 잘 고쳐지는 것과 이웃한 염기서열에 따라 효율이 달라진다는 것이 알려져 있다.

이러한 효율의 차이를 직접 구조적인 차이와 상관이 있다고 결론 내리기는 어렵지만, 아마도 구조적인 차이가 고침작용에 참여하는 효소들에 영향을 미칠 것이

라고 믿기 때문에, 부분적으로든 전체적으로든 왓슨클릭의 염기쌍과는 다른 구조를 하고 있는 불일치 염기쌍의 구조에 관심을 갖게 되었다.

본 연구에서는 불일치 염기쌍인 아데닌 염기의 이웃한 염기서열이 서로 같지 않은 두 개의 올리고머를 합성하여 구조를 비교하여 보았다. 이러한 비교는 핵산 구조의 두 가지 중요한 요소인 염기쌓임(base-stacking)과 염기쌍(base-pairing)의 측면에서 검토되었다.

불일치 염기쌍으로서 아데닌-아데닌을 선택한 것은 지금까지 알려진 A-A 불일치 염기쌍에 대한 연구가 그리 많지 않은 것과 이 종류의 불일치 염기쌍을 고치는 효율이 좋지도 나쁘지도 않아서 이웃한 염기서열이 불일치 염기쌍의 구조에 끼치는 영향을 관찰하기가 쉬울 것으로 생각하였기 때문이다.

본 연구에서는 사용한 핵산 시료의 염기서열은 자체로 대칭구조를 갖기 때문에 스스로 이중나선구조를 이룰 수 있도록 하였는데 불일치 염기쌍을 만들 아데닌 결의 염기가 서로 다른 두 개의 핵산을 합성하였다. 그 염기서열은 먼저 AA1로 이름 붙인 것은 5'-d(CGAGAATTCACG)이고, 또 AA2로 이름 붙인 것은 5'-d(CGACAATTGACG)이다. 이들의 구조적인 차이뿐만 아니라 열역학적인 안정도와 파라미터들도 함께 비교하였다.

나. 실험방법

(1) 올리고머의 합성과 정제 : 데옥시리보핵산 분자는 자동화된 핵산합성기 (Applied Biosystems Inc., Model 392)를 이용하여 포스포라마다이트법으로 합성하였다. 본 연구에서 합성한 분자는 분자량이 모두 3653.788으로서 12개의 염기로 이루어져있으며 서열은 5'-d(CGAGAATTCACG)와 5'-d(CGACAATTGACG)이다. 각각 1 μmole 씩 네 번 합성하여 모두 4 μmole 을 합성하였으며, 3'-다이메톡시트리틸기는 떼고 합성하였다. 합성된 분자는 μmole 당 2 ml 정도로 진한 암모니아수에 55°C에서 16시간동안 담가두었다. 이것은 분자들이 실리카에 지지되어 있는 것을 떼어내기 위한 것이다. 그리고 나서 고체실리카를 제거한 후 암모니아수를 말리고, 고압액체 색층분석기(HPLC)를 사용하여 정제하였다. 이를 위해 말린 시료를 물에 녹여 고속 원심분리로 부유물과 고체 이물질을 제거하였다. 또 사용한 완충용액은 모두 거름 종이로 거르고 용액에 녹아있는 기체를 제거하였다. 완충용액은 20 mM 인산나트륨 용액을 사용하여 산성도를 6.5로 맞추었고 100 mM 농도의 염화나트륨을 사용하였다. 정제에 사용한 칼럼은 DEAE 음이온교환 HPLC 칼럼(NUCLEOGEN[®] 60-7 DEAE)을 사용하였다. 실험조건은 흐름속도는 2 ml/분 이하가 되도록 하였으며, 소금농도 기울기는 처음 용액 A (20 mM 인산나트륨, 10 μM EDTA, 5M 요소, 0.1M 염화나트륨)를 100%로 하고 용액 B (A와 같은 조건, 1.5M 염화나트륨)가 100%가 될 때까지 변화시켰으며 시료가 나오는 근처에서는 염의 변화 기울기가 분당 0.1% 이하가 되도록 조절하였다. 가장 큰 신호에서 용액을 받아서 투석을 통하여 염분을 제거하였다. 그 후에 용매를 날리고 다시 투석법을 통하여 시료를 원하는 조건에 맞추었다. 이때 사용한 반투막은 분자량 1000에서 걸르는 것(MWCO 1000)을 사용하였다. 그리고 나서 동결건조기로 완전히 말린 후 살균한 물로 부피를 맞추었다. 처음 투석을 하여 염분을 제거한 다음 자외선 분광기를 이용하여 시료의 양을 측정하였는데, 이때는 시료가 단일사슬로 되어있다고 가정하며, 260 nm에서 광학적밀도를 측정하여 다음의 식

$$\text{광학적밀도} = \text{상각상수} * \text{농도} * \text{투과거리}$$

에서 투과거리를 기본값 1 cm로 할 때 계산을 통하여 알아낸 상각상수를 이용하여 농도를 계산할 수 있다. 이 때 핵산의 염기서열이 5'-ABCD...Z일 때 상각상수 $\epsilon_{ABC...Z}$ 는 다음의 식으로부터 구한다.

$$\epsilon_{ABC...Z} = 2(\epsilon_{AB} + \epsilon_{BC} + \dots + \epsilon_{YZ}) - (\epsilon_B + \epsilon_C + \dots + \epsilon_Y)$$

이 때, $\epsilon_{AB}, \dots, \epsilon_{YZ}$ 와 $\epsilon_B, \dots, \epsilon_Y$ 는 각각 이염기와 단염기의 뉴클레오타이드의 상각상수이다. 계산으로 알아낸 두 분자의 상각상수는 AA1이 120.2 OD units/ μmole 이고 AA2가 119.2 OD units/ μmole 이다. 다시, 두 분자의 양은 각각 135.0 OD (1.24 μmole) 혹은 129.5 OD (1.09 μmole) 이었다.

(2) 핵자기공명분광법 : 위에서 얻은 시료는 핵자기공명 실험을 하기 위하여

용매 속의 기포를 제거한 후 살균한 물에 녹이는데 농도를 최대로 하기 위하여 0.36 ml에 녹이고 99.96% D₂O(Aldrich, cat. # 26,978-6)를 0.04 ml 더했다. 다시 기준물질에 해당하는 4,4-dimethyl 4-silapentane sodium sulfonate (DSS, from KOR, $\delta = 0.0$ ppm)를 소량 첨가하였다. 이 시료들의 농도는 AA1: 3.1 mM 이고 AA2: 2.7 mM 이었다. 이 시료를 5 mm 지름의 시험관(Wilmad, cat. # 535-pp)에 넣고 플라스틱 마개로 막아서 4 °C 냉장고에 보관하였다. 이렇게 하여 상당한 기간을 보관하였지만 시료가 변질되는 것을 보지 못했다.

이러한 시료조건에서는 이미노 수소핵과 아미노 수소핵이 용매인 물의 수소핵과 치환에도 불구하고 NMR 공명선이 관측되지만, 이 공명선을 제거하기 위하여 시료를 동결건조하고 99.96% D₂O에 녹였다. 가능한 철저하게 H₂O를 제거하고자 이 과정을 3 차례 반복하였다.

모든 핵자기공명실험은 수소핵의 공명주파수가 600.13 MHz이고 인핵의 공명주파수가 242.937MHz인 DMX-600 (Bruker, 독일) 분광기를 사용하였다. 이렇게 얻은 자료는 전용 무른모인 UXNMR에서 처리하였다.

물에서의 NOESY 실험은 0.3초의 믹싱 시간을 주었는데, 이 자료는 아미노 수소와 이미노 수소를 지정하는데 사용한다. 상대적으로 대단히 큰 용매신호는 jump and return pulse sequence(Plateau, 1982)를 사용하여 억제하였다. 1-1 펄스간의 시간차는 40 μ sec 이었다. t_2 는 2K이고, t_1 은 512이었다. 각 FID는 80번 내지 128번을 겹쳐서 모았다. 스펙트럼의 넓이는 8000 Hz 이었다. FID는 다시 인위적으로 squared sine bell 함수를 곱하고 후리에 변환을 하였다.

중수 조건의 실험에서는 phase sensitive NOESY를 얻기 위하여 time proportional phase incrementation (TPPI) phase cycling(Bodenhausen, 1984)을 사용하였다. 역시 mixing time은 300 msec을 주었으며, 이완시간으로는 2초를 주었다. 중수치환 후에 남은 소량의 물 신호를 억제하기 위하여 presaturation법을 사용하였는데, 이 때 decoupling power는 72 내지 78 dB를 사용하였다. t_2 는 2K, t_1 은 400을 주었다. 각 FID는 80 내지 96번을 모았다. 스펙트럼 넓이는 이미노와 아미노 수소핵 공명선이 보이지 않으므로 훨씬 좁힐 수가 있어서 4800 Hz를 주었다. 신호증폭비는 자동으로 정했는데 256 이었다. 이렇게 하여 모두 20 내지 24 시간이 걸렸다.

컴퓨터에 저장한 FID는 후리에 변환을 하여 필요한 정보를 분석하였다.

Single quantum signal을 억제한 phase sensitive DQF-COSY(Derome, 1990) 스펙트럼도 또한 신호지정을 위하여 함께 얻었는데, 이 실험을 통하여서는 또한 scalar coupling constants도 얻을 수 있다. 따라서 높은 분해능을 위하여 t_2 를 4K로 주었고 t_1 은 또한 512 이었다. 96번을 모았고 스펙트럼 넓이는 4464.28 Hz 이었다. 이 자료 또한 후리에 변환을 하여 필요한 정보를 분석하였는데 스펙트럼의 분해능이 약 1 Hz/point 정도였다.

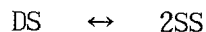
TOCSY (total correlation spectroscopy) 실험도 하였다. 이 것도 COSY와 마

찬가지로 신호지정을 위하여 얻었다. NOESY와 실험조건이 모두 같게 주었다. 다만 MLEV-17 sequence(Bax, 1985)를 49번 돌려서 mixing time은 84.2 msec가 되었다.

수소핵을 관측하는 ^1H - ^{31}P COSY 실험(Sklenar, 1986)은 뉴클레오타이드 사이에서 당수소핵의 관련을 알아보기 위하여 수행하였다. 실험조건은 NOESY 실험과 같으며, 다만 phase sensitive 실험을 위하여 States phase cycling 방법을 사용하였고 t_1 을 200으로 주었다.

(3) Circular Dichroism 실험 : pH 적정 CD 실험은 시료가 산성도를 바꾸었을 때 그 형태가 달라지는 지 아닌 지를 알아보기 위하여 하였다. 이 때 사용한 완충용액은 핵자기공명분광법에서와 같다. 사용한 장비는 Jasco J-715 spectropolarimeter 이었고, 셀의 투과거리는 10 mm 짜리를 사용하였다. 실험온도는 4 °C 이었는데, 이것은 우리가 사용한 시료가 상대적으로 T_m 이 낮기 때문이었다. 온도는 NESLAB RTE-210 온도조절기로 조절하였다. 시료의 농도는 단일사슬 기준으로 60 μM 이었는데, 이것은 먼저 자외선분광기로 측정한 것이다. 산성도는 pH-electrode (Aldrich, cat. # Z11344-1)를 사용하였는데, 이것은 사용 전에 먼저 7.0과 4.0 pH에서 보정하여 4.0과 8.0 범위에서 실험하였다. 모든 CD 스펙트럼은 4 번씩 모아서 평균하였으며 측정 파장범위는 200 nm에서 320 nm까지 이었다. 각 스펙트럼은 밑줄을 보정하였고 곡선으로 연결하였다.

(4) 열역학적 매개변수의 계산 방법 : 핵산이 이중사슬을 만드는 것은 단일사슬 두 개가 만나서 이루어진다. 따라서 이것은 이중사슬과 단일사슬 사이의 가역적 평형반응이라고 생각할 수가 있다. 여기서 이중사슬을 DS, 단일 사슬을 SS라고 한다면, 평형반응은 다음과 같이 표현할 수 있다.



이 반응이 two-state transition model을 따른다고 가정한다면, 평형상수 K_{eq} 는 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$K_{eq} = \frac{C_{SS}^2}{C_{DS}}$$

이 때, C_{DS} 와 C_{SS} 는 각각 이중사슬과 단일사슬 분자의 농도이다. 자외선분광법으로 측정한 단일사슬만으로 있을 때의 농도를 전체농도 C_T 라 하면,

$$C_T = 2C_{DS} + C_{SS}$$

으로 표현할 수 있다. 만약에 이중사슬의 분율(f)이 온도의 함수이라면,

$$f(T) = \frac{2C_{DS}}{C_T}$$

이고, 다시 평형상수 K_{eq} 는

$$K_{eq} = \frac{(C_T - 2C_{DS})^2}{C_{DS}}$$

$$= \frac{2(1 - f(T))^2}{f(T)}$$

으로 쓸 수 있다. 그러면, 이 반응에서 몰당 깁스 자유에너지 변화(ΔG_T)는 온도가 일정할 때,

$$\Delta G_T = \Delta G_T^o + RT \ln K_{eq}$$

으로 쓸 수 있는데 ΔG_T^o 는 표준값이다. 평형상태에서

$$\Delta G_T = 0$$

이므로, 위의 식에서,

$$\Delta G_T^o = -RT \ln K_{eq}$$

$$= -RT \ln \frac{2(1 - f(T))^2 C_T}{f(T)}$$

으로 다시 쓸 수 있으며,

$$\Delta G_T^o = \Delta H^o - T \Delta S^o$$

이므로,

$$\Delta H^o - T \Delta S^o = -RT \ln \frac{2(1 - f(T))^2 C_T}{f(T)}$$

다시 쓰면,

$$\ln \frac{2(1 - f(T))^2 C_T}{f(T)} = -\frac{\Delta H^o}{RT} + \frac{\Delta S^o}{R}$$

이 되고, 이 함수를 y축을 $\ln \frac{2(1 - f(T))^2 C_T}{f(T)}$ 으로 하고 x축을 $\frac{1}{T}$ 으로 하여 fitting하면, 일차방정식

$$y = a + bx$$

에서 y절편은

$$a = \frac{\Delta S^o}{R}$$

그리고, 기울기는

$$b = -\frac{\Delta H^o}{R}$$

일 때, ΔH^o and ΔS^o 를 구할 수 있다. 또, 온도가 25 °C에서 표준 깁스자유에너지는

$$\Delta G_T^o = \Delta H^o - T \Delta S^o = \Delta H^o - (25 + 273.15) \Delta S^o$$

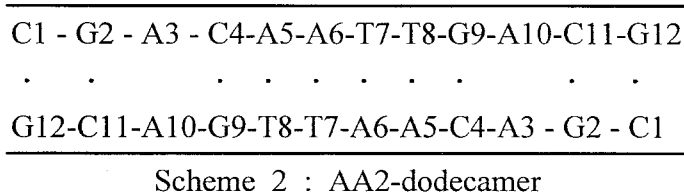
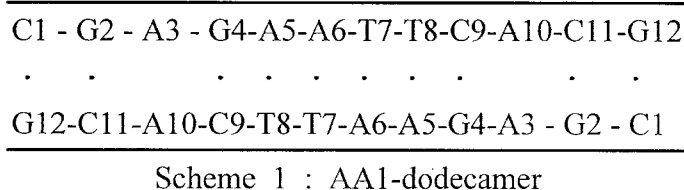
으로 계산할 수 있다.

(5) 분자모델링 : IRMA, SA, rEM, rMD의 방법을 모두 사용하였다. DG를 통하여

50개의 구조를 만들어서 처음 구조로 잡았다. 구조가 원활히 수렴되도록 IRMA를 사용하였으며, Fig. 2-3에 보인 protocol을 사용하여 SA를 수행하였다.

다. 결과 및 토의

(1) 이중나선구조의 형성 : 핵산은 염기서열과 염기의 조건, 사슬의 농도, 온도, 등의 조건에 따라 다양한 이차원 혹은 삼차원 구조를 갖는다. CD 스펙트럼은 NMR 실험 전에 미리 시료가 어떤 구조를 갖는 지를 알 수 있게 해 준다. 먼저 산성도가 중성인 조건에서 시료의 전체 형태를 짐작하기 위하여 CD를 측정하였다. 그림의 스펙트럼에서와 같이 이 시료들은 역평행의 오른방향의 B-DNA 모양을 하고 있는데, 이것은 예상했던 것과 같다. 이것을 근거로 하여 시료분자의 가능한 염기쌍 모양을 아래(Scheme 1 & 2)에 보였다.



수용액 상태에서 시료의 수소핵 스펙트럼을 5.2에서 14.5 ppm 범위에서 그렸다. 모두 열 개의 이미노 수소핵이 있는데 공명선은 5개가 12.2에서 13.9 ppm 사이에 보인다(Fig.2-1). 이것은 두 개의 분자가 대칭적으로 수소결합을 함으로 나타나는 것으로 보이며, 따라서 이 분자는 자체상보적인 이중나선 구조를 하고 있다고 분석할 수 있다. 이미노 수소핵 공명선 5개 중에 가운데의 것은 다른 것과 비교하여 비교적 선폭이 넓고 신호세기가 작은 것으로 미루어 용매인 물분자와 다른 것보다 빠르게 교환하고 있다고 여겨지며, 이 이유로 이 공명선을 끝에 있는 구아닌의 이미노(G12H1) 공명선으로 분석할 수 있다. 이러한 공명선지정은 2차원 NOESY 실험을 통하여 확인할 수 있으며, 그림을 보면 이미노 공명선들의 교차신호들을 2개 확인 할 수 있고, 이것들은 불일치 아데닌 안 쪽의 공명선들에서 나온 것을 알 수 있다. 확인한 이미노 공명선과의 교차신호를 보이는 다른 방향족 수소와 아미노 수소의 공명선은 6.5에서 8.5 ppm 사이에 보인다(Fig. 2-1). 이와 같이 하여 지정한 이미노 수소핵, 아미노 수소핵, 아데닌 2번 수소핵의 화학적이동값을 표(Table 2-1)에 제시하였다. 이렇게 관측한 NOE 교차신호들은 이 염기들이 왓슨클릭이 제한한 염기쌍을 이루고 있을 때 나타나는 것이다. 즉, 불일치 염기인 아데닌에 이웃한 염기들이 B-DNA의 형태를 갖음을 알 수 있다. 이것은 중성 산성도에서 실험한

CD 스펙트럼에서도 알 수 있었다.

(2) 수소핵 공명선의 해석 : 중수 용매에서 이미노 수소핵, 아미노 수소핵의 공명선은 중수소화의 치환으로 더 이상 보이지 않으므로 훨씬 단순화된 스펙트럼을 가지고 방향족 수소핵과 당의 수소핵들을 지정할 수 있다. 앞 절에서 설명한 것처럼 NOESY, DQF-COSY, TOCSY, ^1H - ^{31}P COSY의 실험 자료를 가지고 당의 4' 수소핵까지 지정할 수 있었다. 이 2차원 NMR 자료들은 측정된 분해능 범주에서 충분히 공명선을 지정(Hare, 1983; Scheek, 1984; Weiss, 1984)할 수 있었다.(Fig. 2-2)

먼저, 방향족 수소핵과 당의 H1' 수소핵 사이에 나타나는 교차신호를 순차적으로 해석할 수 있었다. 불일치 염기인 아데닌에서는 교차신호가 끊어지는 것으로부터 이 아데닌에서는 B-DNA 모양에서 어느 정도 벗어나는 것으로 해석할 수 있다. 가장 세게 나타난 세 개의 교차신호는 사이토신의 방향족 수소핵인 H5와 H6 사이의 신호로 해석했으며, 이 것으로부터 이웃해 있는 염기와 당들의 수소핵을 순차적으로 지정해 나갈 수 있었다. 또, 방향족 수소핵과 당의 H2' 수소핵도 마찬가지로 방법으로 교차신호를 순차적으로 해석하여 지정할 수 있었다.(Fig. 2-2) 물론 불일치 염기인 아데닌에서 교차신호가 끊어지는 것을 확인하였다.

당의 수소핵들은 먼저 COSY와 TOCSY의 실험자료를 가지고 일차적으로 지정하였고, NOESY 실험자료를 가지고 확인하며 NOE를 관찰하였다. 리보핵산과는 달리 데옥시리보핵산에서는 H2'에 두 개의 수소핵이 있어서 방향족 수소핵과 거리가 더 짧아서 교차신호가 상대적으로 크게 나타나는 수소핵의 공명선을 H2'으로 지정하고 다른 하나를 H2''으로 지정하였다. 티민의 메틸 공명선은 다른 신호들과 구별되어 고자장쪽에 나타나는 강한 신호를 지정하였으며, 다른 방향족 수소핵과의 NOE를 가지고 확인하였다. ^1H - ^{31}P COSY 실험자료를 가지고는 H3'과 H5'을 부분적으로 지정할 수 있었다. 그 결과를 표(Table 2-1)에 보였다.

(3) 미스매치 이중나선구조의 형태 : 먼저 당의 오각형 고리가 어느 탄소에서 주름이 잡혔는지를 살펴보았다. 이를 위해 당의 수소핵 사이의 스칼라 결합을 측정하였다. $J_{1'2'}$ 과 $J_{1'2''}$ 의 값이 7 Hz에 가까운 것으로 우리는 당이 C2'-endo의 형태를 띠는 것을 알았다. 그러나 불일치 염기와 그 곁의 염기의 경우에는 이 값을 측정하기가 어려웠기 때문에 스칼라 결합상수가 1 내지 2 Hz에 불과하여, 이 염기들의 당은 C3'-endo의 형태에 가까운 것으로 해석하였다(Table 2-2).

핵산에서 인산기와 당의 화학결합들의 비틀림각이 그림에 보인 것같이 정의한다. 먼저 염기와 당사이의 글리코시딕 비틀림각을 살펴보면 *anti* 방향을 하고 있음을 알 수 있다. 이것은 방향족 수소와 당의 H1' 수소사이의 교차신호를 보면 크기가 사이토신의 두 방향족 수소간의 교차신호보다 작아서, 거리가 2.45Å보다 멀다는 것을 알 수 있기 때문이다.

이러한 NOE 값들이 두 시료분자의 경우에 전체적으로는 비교적 비슷하지만 몇

가지에 있어서 차이가 관측되었다. (Fig. 2-2) AA1 분자의 경우에는 G2H8-G2H1' 와 G2H1'-A3H8에서 순차 NOE가 보이지 않았다. 이에 반해 AA2 분자의 경우에는 G9H8-G9H1' 와 G9H1'-A10H8에서 순차 NOE가 보이지 않았다. 이들의 공통점은 불일치 염기인 아데닌의 5' 쪽으로 이웃한 염기가 구아닌인 경우이었다. 이것은 아데닌이 퓨린으로서 피리미딘보다 분자가 크기 때문에 구조가 일그러지는 것으로 해석하였다. 즉, 전체적으로는 B-DNA 모습을 유지하면서 부분적으로 염기가 옆으로 어긋나게 나온 것으로 보인다. 그리고 이와 같은 결과는 일차원 인핵의 스펙트럼에서도 확인할 수 있었다. 이러한 DNA의 구조는 (Fig. 2-3)에 보인 protocol을 이용한 SA법으로 또한 확인할 수 있었는데 그 결과는 (Fig. 2-4)에 보였다. 여기서 AA-1과 AA-2의 구조적 차이가 확연히 드러나며, 이와 같은 이웃한 염기가 미스매치 DNA 구조에 중대한 변화를 이끄는 것을 알 수 있다.

(4) 올리고머들의 열역학적 값들 : 열역학적인 상태를 나타내는 값들인 ΔG° , ΔH° , 그리고 ΔS° 들을 구했다. 이 값들은 온도에 따라 이미노 수소핵의 공명선들의 크기가 변하는 것을 관찰하여 이것이 이중사슬과 단일사슬 사이의 가역적 평형반응이라고 가정(앞 절 참조)하여 얻을 수 있었다. 전체 농도가 일정하고, 산성도가 중성인 조건에서 중심 염기인 A6·T7의 이미노 수소 공명선을 관찰하였다. 앞 절의 식

$$\ln \frac{2(1 - f(T))^2 C_T}{f(T)} = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

으로부터 식의 왼쪽을 온도의 역수에 대하여 그래프를 그려서, 일차방정식의 절편과 기울기로부터 열역학적 변수들을 구할 수 있었다. 이 때 윗 식의 $f(T)$ 는

$$f(T) = \frac{2C_{DS}}{C_T}$$

로 정의하며, 스펙트럼의 수소핵 공명선을 적분하여 구할 수 있었다. 이와 같이하여 얻은 열역학 매개변수 값들을 표(Table 2-3)에 나타내었으며, 실온에서의 깁스 자유에너지변화값도 또한 계산하였다.

분자의 안정도를 나타내는 다른 온도값은 녹는점이다. 이것은 이중사슬이 온도가 올라가면서 단일사슬이 되는데 전체의 반이 풀리는 온도를 나타낸다. 이것도 또한 이미노 수소핵의 공명선을 관찰함으로써 얻을 수 있었다. 각 염기쌍의 수소결합들은 온도가 올라가면서 풀리기 시작하는데, 제일 먼저 바깥쪽의 수소결합이 풀리고 그 다음 번의 염기쌍이 풀리며, 마지막으로 안쪽의 염기쌍들이 거의 동시에 풀리는 것을 관찰하였다. 낮은 산성도에서도 녹는점을 조사하였는데, 중성 산성도에서보다 약 10 °C 가량 낮은 값을 나타내었고, 시료분자들에 있어서는 AA1이 AA2보다 약 5 °C 가량 낮은 값을 나타내었다.

(5) 평행한 이중나선 구조의 형성 : 산성도가 달라지면 분자의 형태가 어떻게

달라지는 지를 알기 위하여, pH를 바꾸어 가며 CD와 NMR 실험을 수행하였다. 이미노 수소핵의 공명선이 선폭이 넓어지며 점차로 사라지는 것을 관찰하였다. (Fig. 2-5) 이것은 열역학적으로 낮은 pH에서 녹는점이 낮아지는 것과도 관련이 있는 것으로 생각되며, 또 용매인 물의 수소핵과 치환이 빠르고 활발하게 이루어진다고 생각된다. 그리고 전체 스펙트럼에 변화가 관찰되었는데, AA1분자에서보다는 AA2분자에서 중성 산성도에서는 관찰되지 않았던 아미노-이미노 화학적이동 범위에서 새로운 공명선들이 더욱 뚜렷하게 나타나기 시작하였다. 이것은 기존의 이미노 수소핵 공명선의 화학적이동이 점차로 변해서 나타나는 것이 아니기 때문에, 아마도 분자가 기존의 형태와는 다른 형태를 갖는 것으로 생각하였다. 특이한 것은 약 15 ppm 근처의 낮은 자기장에서의 새로운 공명선인데, 다른 문헌들을 조사한 것으로는 이것이 아마도 핵산사슬이 역평형상태로 수소결합한 것이 아니고 평형상태로 결합하면서 생긴 것이라고 해석하였다. 이것은 낮은 산성도에서 사이토신에 수소가 결합하면서 본래 존재하지 않았던 이미노 수소를 만들어서 가능해진 것으로 생각된다. 이와 같은 해석을 뒷받침하기 위하여 우리는 다시 CD를 측정하였다. CD 스펙트럼(Fig. 2-5)의 결과에서도 평형 이중사슬의 가능성을 강하게 확인할 수 있었다. 보통의 B-DNA의 경우에는 약 280 nm에서 극대값을 보이고 245 nm에서 극소값을 보이는 반면, 평형상태에서는 극대값이 더 단파장쪽으로 이동하는 양상을 보이는데, 우리의 경우가 그러하였다. 또 극소값으로는 약 220 nm에서 최소값을 나타내는데, 우리의 경우에는 극소값을 보이지만, 확연하게 최소값을 주지는 않았다. 이것은 이 시료분자가 충분히 안정한 평형 이중사슬을 만들지는 않는다는 것을 의미한다. 이것은 NMR의 선폭들이 대단히 넓고 신호세기가 충분히 크지 않는 것에서도 짐작했던 것이다.

최근의 평형사슬의 구조는 삼중사슬과 사중사슬 등의 핵산 구조 연구(Feigon, 1995)에서 나타났다. 그러나 이중사슬의 평형상태는 예외적인 것으로 여겨졌다. 이런 구조는 매우 낮은 산성 조건(Rich, 1961; Brown, 1985; Sarma, 1986; Luo, 1992)이나, 화학적으로 변조하거나, 리간드와의 상호작용(Germann, 1995)으로 나타난다. 우리의 경우에는 낮은 산성조건에서 이 새로운 구조가 어떤 염기결합을 하는지에 관심을 가졌다. 또 염기서열에 있어서 5'-CGA의 구조가 이와 같은 평형사슬의 형성에 유리하다고 보고(Robinson, 1993)되었다. 사이토신의 경우에는 C:C+의 결합이 가능하며, GpA의 경우에도 사슬간의 G-A가 안정(Li, 1991a; Li, 1991b)하기 때문인 것으로 생각된다. 결론적으로 낮은 pH에서 이 불일치 아데닌을 포함한 올리고핵산은 새로운 형태를 나타내는데 이것은 평형 이중사슬 구조이었다.

라. 참고 문헌

- Aboul-ela, F., Koh, D., and Tinoco, Jr., I. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13, 4811-4824
- Arnold, F. H., Wolk, S., Cruz, p., & Tinoco, I., Jr. (1987) *Biochemistry* 26, 4068-4075
- Bax, A. and Davis, D. G. (1985) *J. Magn. Reson.*, 65, 355-360
- Bodenhausen, G., Kogler, H., & Ernst, R. R. (1984) *J. Magn. Reson.*, 58, 370-388
- Borden, K. L. B., Jenkins, T. C., Skelly, J. V., Brown, T., & Lane, A. N. (1992) *Biochemistry* 31, 5411-5422
- Brown, D. M., et. al, (1985) *Biochemistry*, 24, 1976
- Brown, T., Hunter, W. N., Kneale, G. & Kennard, O. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 83, 2402-2406
- Brown, T., Leonard, G. A., Booth, E. D., & Chambers, J. (1989) *J. Mol. Biol.*, 207, 455-457
- Cheng, J.-W., Chou, S.-H. & Reid, B. R. (1992) *J. Mol. Biol.* 228, 1037-1041
- Cognet, J. A. H., Gabarro-Arpa, J., Le Bret, M., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., & Fazakerley, G. V. (1991) *Nucleic Acids Res.* 24, 6771-6779
- Cornelis, A. G., Haasnoot, J. H. J., den Hartog, J. F., de Rooij, M., van Boom, J. H. & Cornelis, A. (1979) *Nature* 281, 235-236
- Crick, F. H. C. (1966) *J. Mol. Biol.* 19, 548-555
- Derome, A. E. (1990) *J. Magn. Reson.*, 88, 177-185
- Fazakerley, G. V., Quignard, E., Woisard, A., Guschlbauer, W., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Jones, M. & Radman, M. (1986) *EMBO J.* 5, 3697-3703
- Feigon, J. *Method in Enzymology* vol 261, 1995, Nuclear Magnetic Resonance and Nucleic Acids, chapter 10
- Fersht, A. R., Knill-Jones, J. W., & Tsui, W.-C. (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 37-51
- Gao, X. & Patel, D. J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16973-16984
- Gao, X. & Patel, D. J., (1988) *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5178-5182
- Germann, M. W., et. al, *Method in Enzymology* vol 261, 1995, Nuclear Magnetic Resonance and Nucleic Acids, chapter 9
- Gervais, V., Cognet, J. A. H., Bret, M. L., Sowers, L. C., & Fazakerley, G. V. (1995) *Eur. J. Biochem.* 228, 279-290

- Hare, D. R., Wemmer, D. E., Chou, S. H., Drobny, G., and Reid, B. R. (1983) *J. Mol. Biol.* **171**, 319-336
- Hunter, W. N., Brown, T., Anand, N. N., & Kennard, O. (1986) *Nature* **320**, 552-555
- Kan, L. S., Chandrasegaran, S., Pulford, S. M. & Miller, P. S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **80**, 4263-4265
- Katahira, M., Kanagawa, M., & Uesugi, S. (1994) *Nucleosides & nucleotides*, **13**, 1507-1515
- Katahira, M., Sato, H., Mishima, K., Uesugi, S. & Fujii, S. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5418-5424
- Keepers, J. W., Schmidt, P., James, T. L., & Kollman, P. A. (1984) *Biopolymers* **23**, 2901-2929
- Kennard, O. (1985) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**, 205-226
- Kramer, B., Kramer, W. & Fritz, H. J. (1984) *Cell* **38**, 879-887
- Lane, A. N. & Peck, B. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 1073-1087
- Li, Y., Zon, G. & Wilson, W. D. (1991a) *Biochemistry*, **30**, 7566-7572
- Li, Y., Zon, G. & Wilson, W. D. (1991b) *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **88**, 26-30
- Luo, J., et. al, *FEBS Lett.* **306**, 223, 1992
- Maskos, K., Gunn, B. M., LeBlanc, D. A., & Morden, K. M. (1993) *Biochem.* **32**, 3583-3595
- Moe, J. G. & Russu, I. M. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8421-8428
- Patel, D. J., Kozlowski, S. A., Ikuta, S. & Itakura, K. (1984a) *Biochemistry*, **23**, 3207-3217
- Patel, D. J., Kozlowski, S. A., Ikuta, S., & Itakura, K. (1984b) *Biochemistry* **23**, 3218-3226
- Patel, D. J., Kozlowski, S. A., Marky, L. A., Rice, J. A., Broka, C., Dallas, J., Itakura, K., & Breslauer, K. J. (1982) *Biochemistry*, **21**, 437-444
- Plateau, P and Gueron, M. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7310-7311
- Prive, V. I., Heinemann, U., Chandrasegaran, S., Kaan, L. S., Kopka, M L., & Dickerson, R. E. (1987) *Science*, **238**, 498-504
- Rich, A. et. al, 1961, *J. Mol. Biol.* **3**, 71
- Robinson, H. & Wang, A. H.-J., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 5224-5228
- Sarma, M. H., et. al, *FEBS Lett.* **205**, 223, 1986
- Scheek, R. M., Boelens, R., Russo, N., van Boom, J. H., and Kaptein, R. (1984) *Biochemistry* **23**, 1371-1376

Skelly, J., Edwards, K., Jenkins, T. C. & Neidle, S. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 190, 804-808

Sklenar, V., Miyashiro, H., Zon, G., Miles, T. and Bax, A. (1986) FEBS Lett., 208, 94-98

Topal, M. D., & Fresco, J. R. (1976) Nature 263, 285-293

Traud, W. & Sussman, J. L. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 2701-2708

Venable, R. M., Wildman, G., Brooks, B. R., Egan, W. & Pastor, R. W. (1992) Biopolymers 32, 783-794

Weiss, M. A., Patel, D. J., Sauer, R. t., and Karplus, M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 130-134

Table 1(a). The assigned chemical shifts of AA-1

Base	H6/ H8	H1'	H2''	H2'	H3'	H4/H5'/H5''	Me/H2/H5	NH/NH2
C1	7.53	5.71	2.25	1.75	4.64	4.01, 3.63	5.84	
G2	7.84	4.86	2.41	2.49	4.10	3.99, 3.86	-	12.90
A3	8.20	5.87	2.85	2.78	5.04	4.39		
G4	7.63	5.44	2.65	2.50	4.98	4.35,4.17	-	12.42
A5	8.09	5.97	2.92	2.68	5.06	4.19, 4.46	7.14	7.38, 6.08
A6	8.09	6.11	2.91	2.54	4.99	4.24, 4.44	7.56	7.09, 6.08
T7	7.10	5.88	2.55	1.96	4.81	4.34, 4.17	1.22	13.72
T8	7.34	6.01	2.51	2.12	4.88	4.06	1.50	13.87
C9	7.39	5.51	2.12	1.66	4.81	4.14, 4.04	5.64	8.29, 6.99
A10	8.28	6.19	2.85	2.84	5.02	4.11, 4.45	8.23	
C11	7.23	5.63	2.22	1.68	4.76	4.26, 4.11	5.35	8.36, 6.78
G12	7.93	6.14	2.36	2.67	4.69	4.20, 4.05	-	13.00

Table 1(b). The assigned chemical shifts of AA-2

Base	H6/ H8	H1'	H2''	H2'	H3'	H4/H5'/H5''	Me/H2/H5	NH/NH2
C1	7.48	5.68	2.20	1.69	4.60	3.99, 3.60	5.79	6.85
G2	7.85	4.78	2.47	2.57	4.62	4.12	-	12.71
A3	8.21	6.19	2.80	2.77	5.00	4.42, 4.03	8.30	5.51
C4	7.10	5.30	2.08	1.59	4.69	4.04	5.15	7.97, 6.16
A5	8.17	5.86	2.88	2.74	4.99	4.38	7.04	7.35, 5.97
A6	8.11	6.06	2.84	2.52	4.94	4.40, 4.18	7.43	6.99, 5.92
T7	7.03	5.77	2.43	1.87	4.75	4.25, 4.08	1.20	13.45
T8	7.12	5.75	2.24	1.89	4.80	4.01, 3.86	1.50	13.61
G9	7.76	4.99	2.43	2.44	4.19		-	12.28
A10	8.21	6.16	2.79	2.77	5.00	4.38, 4.06	8.31	7.96, 5.63
C11	7.16	5.59	2.15	1.62	4.71	4.22, 4.08	5.22	8.11, 6.51
G12	7.88	6.09	2.30	2.60	4.62	4.15, 4.01	-	12.85

Table 2. Sum of coupling constants in the duplex, $J_{H1'}$ ($=J_{1'2'} + J_{1'2''}$) and molar fraction of S-type sugar conformer, pS ($=(J_{H1'} - 9.4)/(15.7 - 9.4)$). *: overlapped.

AA-1			AA-2		
Residue	$J_{H1'}$ (Hz)	pS (%)	Residue	$J_{H1'}$ (Hz)	pS (%)
C1	14.38	79.0	C1	14.67	83.7
G2*	-	-	G2*	-	-
A3*	-	-	A3*	-	-
G4	13.5	65.1	C4	14.04	73.7
A5	14.04	73.7	A5	14.16	75.6
A6	14.12	74.9	A6	14.08	74.3
T7	14.26	77.1	T7	14.35	78.6
T8	14.62	82.9	T8	14.71	84.3
C9	14.67	83.7	G9	14.82	86.0
A10	14.67	83.7	A10	14.67	83.7
C11	14.31	77.9	C11	14.04	73.7
G12	14.83	86.2	G12	14.69	84.0

Table 3. Thermal properties of the two molecules: T_m ($^{\circ}\text{C}$), H° , S° , and G°_{298} .

Base-Pair	T_m ($^{\circ}\text{C}$)					H° (kcal/mol)	S° (cal/mol.K)	G°_{298} (kcal/mol)
	1	2	4	5	6			
AA-1, pH=7.04	15	27	40	40	40	-19.4	-50.0	-4.56
AA-2, pH=7.02	15	33	47	47	47	-32.3	-88.8	-5.86

Table 4. The calculated average energies and RMSD of the two molecules after restrained energy minimization

Molecule		AA-1	AA-2
Energy	Total energy	-69.9±3.7	-119.4±3.7
	Bond energy	18.1±0.5	12.4±0.5
	Theta energy	147.2±4.2	108.4±7.2
	Phi energy	231.1±3.7	248.2±3.8
	Hydrogen-bond energy	-16.3±1.0	-16.2±0.4
	Nonbond energy	-207.4±8.4	-224.1±2.8
	Nonbond repulsion energy	784.3±13.6	775.5±5.6
	Nonbond dispersion energy	-993.4±20	-999.6±8.4
	Coulomb energy	-243.3±3.5	-248.4±1.1
	Forcing potential	101.4±12.9	66.5±0.1
Evaluation	R-factor	0.005 ± 0.0007	0.011 ± 0.0004
Number of Restraints	Distance restraints	60	82
	Chiral restraints	72	72
	Dihedral restraints	526	526
	NOE restraints	374	400

Table 5. The comparisons of reported AA mismatched DNAs with ours.

Author	Sequence	Base Stacking	Hydrogen Bonding	Remarks
Tinoco	5'-dCAG GAC	Stacking Stacking	X	Symmetric
Mordern	5'-dGAA AAT	Stacking Stacking	AHa-AN3	Tandem mismatch
Fazakerley	5'-dCAA GAT	Stacking Stacking	AN1-AHa AHa-AN1	Dynamic equilibrium
Here	5'-dGAC CAG	Stacking Stacking	AN1-AHa	Not-symmetric
Here	5'-dGAG CAC	Loop-out Stacking	X	

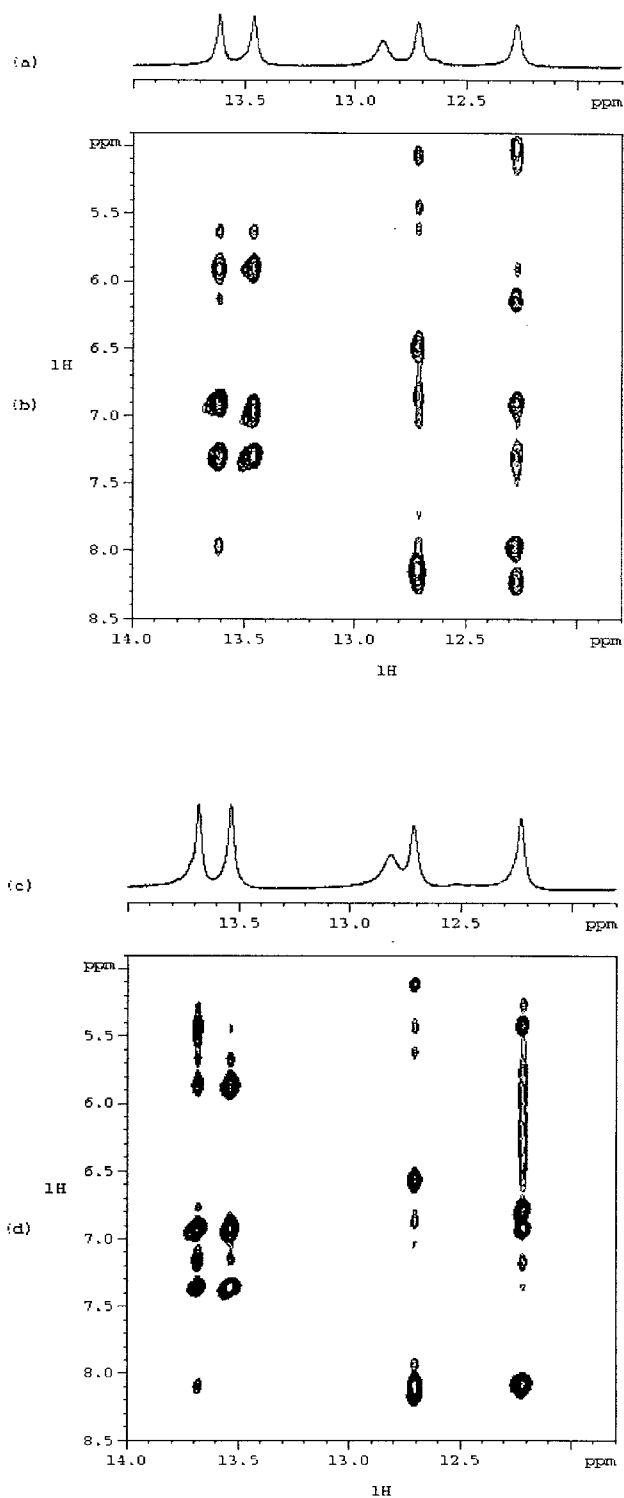


Fig. 2-1. The resonances of imino protons and expanded NOESY of AA-1 (a, b) and AA-2 (c, d), respectively.

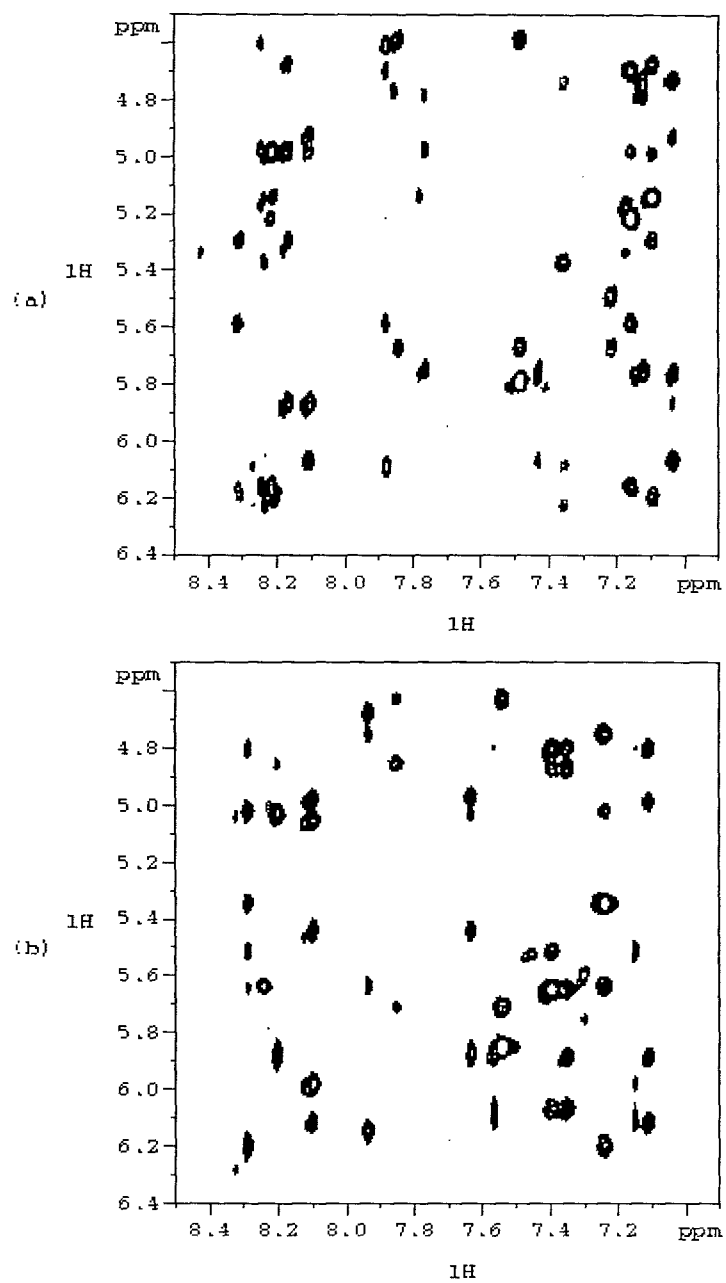


Fig. 2-2. The expanded NOESY of (a)AA-1 and (b)AA-2.

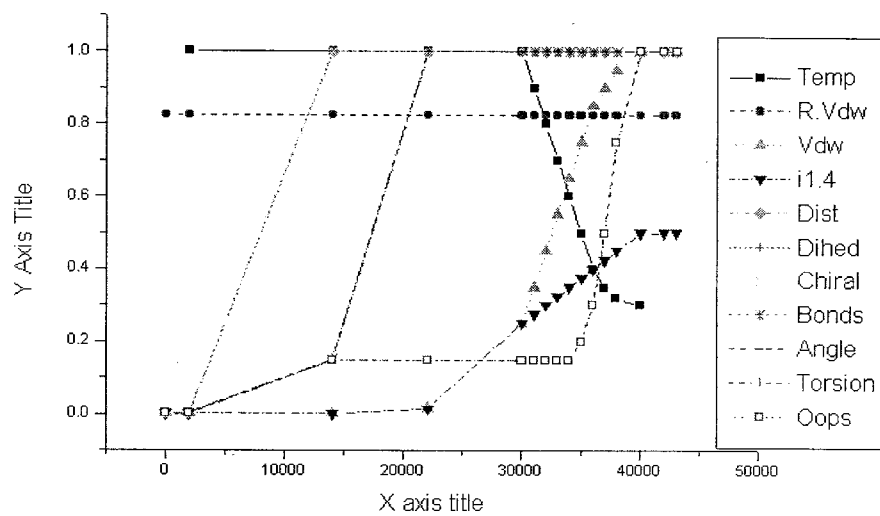


Fig. 2-3. The diagram of simulated annealing protocol.

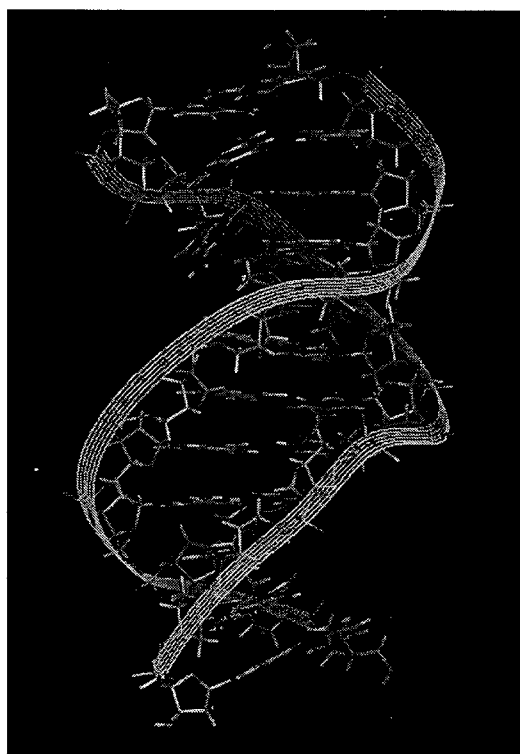
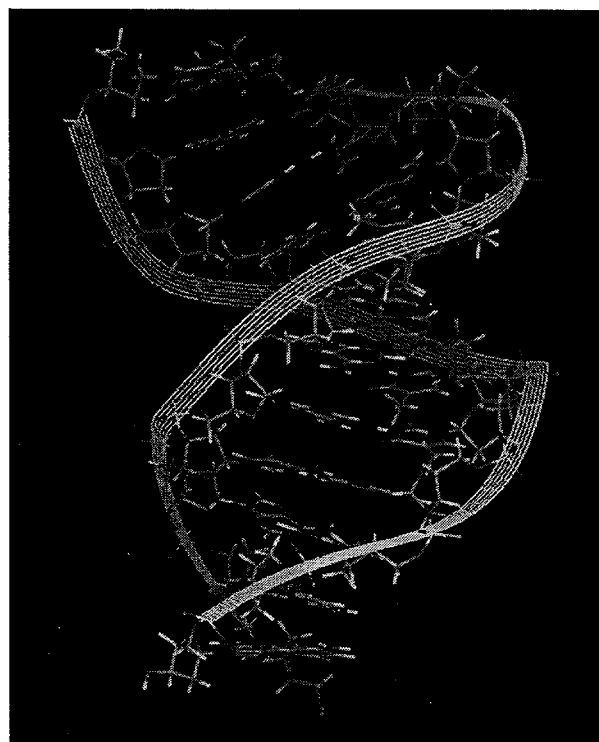


Fig. 2-4. The modeled structures of (a)AA-1 and (b)AA-2.

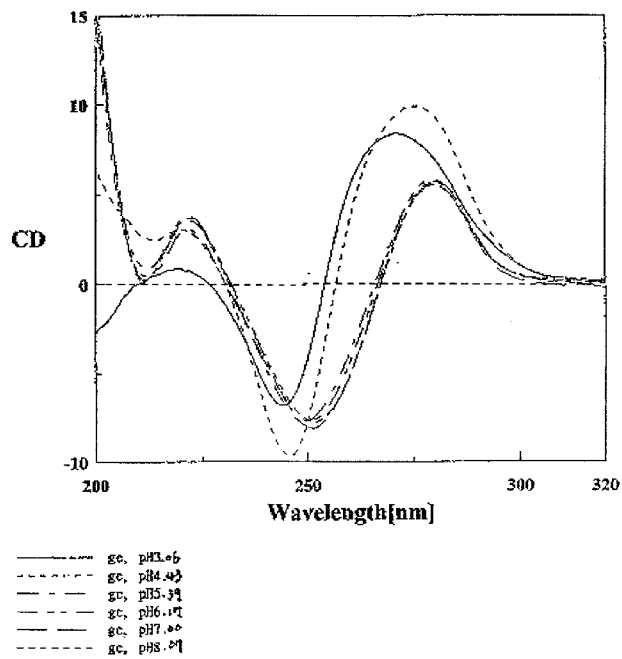
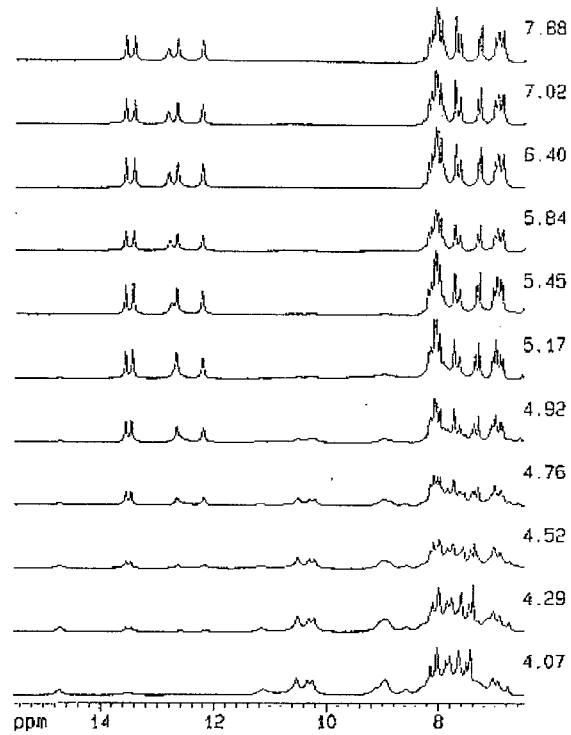


Fig. 5. The evidence of parallel-stranded double helical structure of AA-1. 1D NMR proton spectra and CD spectra at various pH's

2. UV 손상 DNA Base 구조

가. 서론

DNA 염기들은 생체대사 과정에서 다양한 산화산물들이 생성되는데 이러한 기작을 가능하게 하는 reactive species들은 γ -radiation(von Sonntag, 1987; Nackerdien, 1992; Kasai, 1986)이나 과산화수소(Floyd, 1988; Henle, 1996; Aruoma, 1991)로부터 생성된 hydroxyl radical, singlet oxygen(Devasagayam, 1991; Ravanat, 1997), superoxide radical, 또는 산소를 포함하는 radical종(von Sonntag, 1987; Kenedy, 1995)등이 있다. 이들은 핵이나 mitochondrial DNA(Richter, 1988; Yakes, 1997)를 공격하여 다양한 변형염기를 형성하게 된다. Nucleobase와 deoxyribose들의 산화구조들과, oxidative purine과 oxidative pyrimidine의 구조들이 널리 연구되고 있다.(Zuo, 1995; Martini, 1997) 특별히 8-oxo-guanosine과 8-oxo-adenine, 5-hydroxyuracil, 5-hydroxycytosine, 및 uracil glycol등이 DNA산화에 의한 변형구조로 상대적으로 높은 수율로 얻어짐이 보고되고 있다.(Richter, 1988) 어떤 DNA base들은 산화과정에서 hydrolytic deamination과정을 수반한다.(Singer, 1983) Cytosine은 다른 염기들과 달리 deamination과정이 자발적으로 일어나는 것으로 이미 알려져 있고(Singer, 1983) 다양한 산화 조건에서 연구가 이루어지고 있다.(Zuo, 1995; Privat, 1996; Dizdaroglu, 1986; Caulfield, 1998) Deamination과정은 GC를 TA로 전환시켜(Cheng, 1992) DNA손상복구과정의 변이를 초래한다(Friedberg, 1995; Zharkov, 1997; Bulychev, 1996). Free radical에 의한 이와 같은 손상은 결국 비정상적인 복제과정으로 이어져 돌연변이, 염색체이상, 세포노화, 유전적 결함까지 이어져 결국 암까지 발생하게 된다.(Cheng, 1992; Moriya, 1993)

Superoxide radical과 과산화수소 같은 Oxygen-derived species들은 모든 호기성세포에서 발견되며 세포내, 조직내의 수분에 의한 ionizing radiation의 결과로 hydroxyl radical이 형성된다. Hydroxyl radical은 다수의 modified bases를 생성한다. 하지만, 과산화수소의 존재 하에서의 자외선조사에 의한 변형염기의 구조는 많이 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 여러 가지 DNA base들의 oxidation 조건에 따른 구조 변화를 관찰하고 데이터베이스화 하는 것에 그 목적이 있다. Cellular DNA의 oxidative bases들의 구조 고찰은 세계적으로도 많은 관심이 집중되고 있는 연구 분야인데, 본 연구에서 adenine, guanine, thymine 그리고 cytosine의 손상된 변형 염기 구조를 밝혀내었고, 특히 thymine과 cytosine에 있어서의 시간에 따른 구조변형과정을 실험결과로부터 제안하였다.

DNA base들의 구조 변이에 영향을 미치는 주요 원인을 자외선의 조사시간(irradiation time)과 산화제의 첨가량으로 설정하고 변형 염기 구조 관찰이 용이

한 산화제의 최적 농도를 먼저 결정한 후, 자외선의 조사시간을 변화시켜가면서 이에 따른 photooxidative product들의 상대적인 생성 정도 변화를 측정하였다. 최종적으로 시판되고 있는 Calf Thymus DNA를 직접 물에 녹여 자외선을 위와 같은 조건에서 조사하고 이를 가수분해한 후 유도체화 반응을 거쳐 GC/MS를 이용하여 분리 및 분석하였다.

몇 가지 분석방법이 개발되어 있는데, 전기화학적 검출법을 이용한 고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC/EC)(Shigenaga, 1994; Adachi, 1995)과 질량분석법을 검출법으로 한 가스크로마토그래피/질량분석법(GC/MS)(Dizdaroglu, 1993; Teixeira, 1995)이 크게 대두되고 있다. HPLC-EC법은 자체적으로 좋은 감도를 지닌 분석법이지만 하나, 상대적인 감도는 GC/MS법에 떨어지며 또한 EC-detector는 다양한 성분 분석에 불리하여, 다양한 변형염기들의 동시분석에는 적합하지 못하다. 따라서, 보다 우수한 검출감도와 선택성을 지니며 다성분 동시분석이 가능한 GC/MS법이 본 연구에서는 매우 적합한 방법으로 선택되었다. 특히 trimethylsilyl(TMS)유도체화를 통하여 더욱 우수한 감도와 선택성을 얻을 수 있었다.(Hong, 1998; McCloskey, 1985; Crain, 1990) 특히 질량분석기의 '선택적 이온 탐지법(selected ion monitoring, SIM)'을 이용하여 특정 분자량을 가진 product 이온에 대해 이온 전류를 시간의 함수로 측정해 줌으로써 여러 photooxidative product들의 혼합물 질량 스펙트럼속에서 관찰하고자한 목적 이온만을 정확하고도 선택적으로 검출해 낼 수 있었다.

나. 실험 방법

(1) 시약 : 실험에 사용된 DNA base들과 Calf Thymus DNA는 Aldrich(Milwaukee, WI, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다. Formic acid는 Janssen Chimca(Geel, Belgium)사의 제품을 구입하여 사용하였다. 1% trimethylchlorosilane(TMCS)가 첨가된 N-methyl-N-trimethylsilylacetamide(MSTFA), silylating grade acetonitrile, pyridine은 Pierce chemical company(Rockford, IL, USA)사 제품을 사용하였다. Osmium tetroxide는 Sigma(Milwaukee, WI, USA)사의 제품을 사용하였고, 초순수는 Milli-Q시스템(Millipore, USA)을 이용하여 제조된 초순수를 사용하였다.

(2) Oxidation of DNA bases with OsO₄ : 변형염기들은 상업적으로 구입하기 어렵기 때문에 각 염기의 산화종들을 확인하기위해 OsO₄를 이용하여 DNA base들을 산화시켜 대비화합물을 만들었다. DNA base(0.4mg)을 2% OsO₄ 액을 가하여 60°C에서 1시간 반응시켰다. 생성물은 검은색을 나타내며 냉동실에서 반응을 멈추어주고 "Freeze and Dry"법으로 수분을 제거해 주었다.

(3) Irradiation and hydrolysis : 각각의 DNA base들 각각 10 μg을 2%과산화수소가 첨가된 2mL수용액으로 제조한다. 반응액을 자외선에 각각 5, 10, 15, 20, 30분씩 high pressure mercury lamp(Hanovia Photochemical Lamp, 600W)를 이용해서 조사시키고 air-cooled glass filter를 사용해서 310nm이하의 파장을 차단한다. 자외선조사가 끝난 반응액을 냉동고에서 급속냉동하고 동결건조법을 이용하여 수분을 완전히 제거한다. Calf thymus DNA의 경우에는 먼저 88%의 formic acid를 가하여 130°C에서 40분간 가수분해시켜서 동결건조한 다음 N₂ 대기하에서 1% TMCS가 포함된 MSTFA를 100 μL를 가하여 100°C에서 TMS유도체화 시킨 후, GC/MS로 분석한다.

(4) GC/MS 분석 : JEOL SX-102A double focusing mass spectrometer (Akisima, Japan) 질량분석기를 Hewlett-Packard 6890 series gas chromatography장치와 연결한 시스템으로 분석하였다. 사용된 컬럼은 DB-5MS 캐필러리 컬럼(30m, I.D 0.25mm, 정지상두께 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA)를 사용하였다. 고순도 헬륨가스를 0.9mL/min의 유속으로 흘려주었다. 샘플주입은 splitless법으로 주입하였으며 GC의 주입구 온도는 250°C로 유지하였다. GC의 오븐온도 프로그래밍(temperature programing)은 초기온도 80°C에서 3분간 유지한후 분당 20°C의 속도로 180°C까지 증가시킨 후, 분당 20°C의 속도로 280°C까지 올리고 10분간 유지하여 실험을 끝내도록 하였다. 이온화방법은 전자충격법(EI)을 사용하였으며, 70eV를 사용하였다. 이온화실의 온도는 200°C를 유지하여 주었다. 질량탐지범위는 50~600 amu였으며, GC/MS interface온도는 270°C를 유지하였다.

다. 결과 및 토의

일반적으로 과산화수소는 생리화학적 환경에서는 직접적으로 DNA bases들을 변형시키지 못한다. 그러나, 과산화수소는 자외선의 조사나, 화학물질, 또는 금속에 의해서 반응성 산화종(reactive oxygen species, ROS)을 형성하게 된다. 생성된 반응성 산화종들은 DNA base들과 반응하여 다양한 변형구조를 형성하게 된다. 극미량으로 생성되고 GC/MS의 '재구성된 총이온크로마토그램(RTICC)'에서 adenine과 겹쳐서 나타나는 4,6-diamino-5-formamido pyrimidine (FAPy-adenine)에 매우 효과적으로 적용되었다. 또한, 2,6-diaminopurine을 이용한 '내부표준물첨가법'과 선택적 이온 탐지법을 이용하여 생성된 photooxidative product들의 '상대적인 생성비값'을 측정하였다. 생성된 photooxidative products의 전체 수율 또한 자외선만을 조사하였을 때 보다 2%의 과산화수소가 포함된 경우가 현저히 높았다. 위와 같은 결과로 자외선을 조사해주는 조건에서는 자외선에 의한 과산화물의 분해가 일차적으로 이루어지고 이로 인해 생성된 라디칼이 DNA base를 공격하는 것으로 반응 단계를 알 수 있었다.

지정된 GC/MS 실험 조건에서 adenine-TMS 유도체는 13.5분에서 매우 강하게 나타났고, 대표적인 oxidative product인 FAPy-adenine은 adenine보다 앞서 나타났으며, 8-hydroxyadenine과 2-hydroxyadenine은 14.3분과 15.2분에서 각각 나타났고, 내부 표준 물질로 첨가하여준 2,6-diaminopurine의 TMS유도체는 15.8분에서 검출되었다. Purine 계열인 adenine은 pyrimidine 계열인 thymine보다 보다 견고한 골격 구조를 가지므로 서로 다른 mass spectrum형태를 보여주고 있는데, 8-hydroxyadenine과 2-hydroxyadenine은 purine 구조를 그대로 유지하고 있으므로 molecular ion과 (M-15)⁺이온이 강하게 나타나는 반면, FAPy-adenine은 hydroxy radical의 공격에 의해 한 쪽 ring이 깨어져 pyrimidine구조를 가지게 됨으로써 molecular ion과 (M-15)⁺이온이 약하게 나타나는 결과를 얻었다.

Adenine의 photooxidative product인 8-hydroxyadenine과 2-hydroxyadenine, 그리고 FAPy-adenine의 자외선 조사 시간의 변화에 따른 생성량의 변화를 Fig. 2-2-2에 나타내었다. 8-hydroxyadenine과 2-hydroxyadenine의 경우 공통적으로 자외선을 조사하기 시작했을때부터 20분이 경과했을 때 생성량이 가장 많은 것으로 나타났다. Fig. 2-2-2에 나타난대로 8-hydroxyadenine의 존재량에 비해, 2-hydroxyadenine의 존재량은 적은 것으로 나타났다. 이는 hydroxy radical이 주로 N7-C8 site를 공격하는데서 기인된 결과이다. 20분이 지나가면서 두가지 생성물의 존재량이 감소하기 시작한다. 이것은 결국 두가지 oxidative product가 모두 계속되는 자외선의 조사에 의해 또 다른 oxidative product로 구조의 변이가 일어나는 것을 알 수 있다. 이에 따라 Fig. 2-2-2 좌측하단에 나타난 FAPy-adenine의 존재량의 변화가 매우 흥미로운 결과를 나타내었다. FAPy-adenine은 purine의 5-membered ring이 깨어져서 pyrimidine이 된 경우인데, FAPy-adenine의 존재량은

시간이 경과 할수록 증가하고 있다는 점이 주목된다. 이 두가지 결과에서 결국 8-hydroxyadenine이나 2-hydroxyadenine이 시간이 경과됨에 따라 이들의 구조도 FAPy-adenine으로 변이가 일어난다고 볼 수 있다. 또한, FAPy-adenine의 경우 과산화수소의 존재유무에 따른 변화량을 볼 수 있다. 자외선 만으로도 그 조사시간이 길어질 경우 미량이나마 생성될 수 있음이 관찰되었으며, 역시 다른 oxidative product와 마찬가지로 과산화수소가 존재할 경우 그 양이 다량 증가하는 결과를 얻었다.

Photooxidative product는 TMS 유도체화 반응 중 미량이 생성될 수 있음이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 adenine의 경우를 관찰하였는데 8-hydroxyadenine이 TMS 유도체화 반응 중에 미량 생성된 것이 관측되었다. 따라서, 이를 방지하고자 antioxidant인 N-phenyl-1-naphthylamine(PNA)을 유도체화 반응시 가하고 유도체화 반응시간을 점점 증가시켜가면서 변화를 관찰한 결과를 Fig. 2-2-2 우측하단에 도시하였다. 결과적으로 PNA를 가했을 경우에는 8-hydroxyadenine이 거의 생성되지 않았고, 유도체화 반응이 진행될 동안의 양의 변화도 거의 나타나지 않았다. 그러나 PNA를 가하지 않았을 경우, 8-hydroxyadenine의 양은 점차적으로 생성량이 증가함을 볼 수 있다.

DNA의 손상된 구조를 연구할 때, 지금까지 guanine이나 다른 base들에 비해 adenine의 photooxidative product는 그리 주목받지 못했다. 그러나 본 연구 결과에 의하면 조건에 따라서 생성되는 8-hydroxyadenine, 2-hydroxyadenine이나 FAPy-adenine도 반드시 함께 고려되어야 한다고 생각한다. 특히 8-hydroxy- 및, 2-hydroxyadenine의 경우 일정시간이 지나 그 양이 다시 감소하는 것으로 다른 구조로의 변이가 확실하고, 이에 반해 FAPy-adenine의 양이 점차 증가하는 것으로 볼 때, 다른 base들에 대한 연구 못지 않게 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

DNA base인 thymine의 Photooxidative product의 생성을 위해 수용액에 2% 과산화수소를 가하고, 2mL씩 분취하여 자외선을 각각 10, 15, 20 그리고 30분씩 조사해 주었다. 각 용액을 건조한 후, 유도체화 반응을 거쳐 GC/MS로 분석하였다. 2%의 과산화수소가 포함된 용액에 자외선을 조사해주었을 때는, 포함하지 않았을 경우와 비교한 결과 thymine의 감소정도가 10배에 이르는 것이 확인되었으며 Fig. 2-2-3에 결과를 도시하였다. 또한, 포함되는 과산화수소의 양을 증가시켰을 경우에도 감소 정도는 증가되었다. 그러나, 자외선만을 조사하였을 때에는 thymine의 감소는 매우 더딘 것으로 나타났다. 그러므로 thymine의 변형은 과산화수소로부터 생성되는 hydroxyl radical이 주된 요인임을 알 수 있다.

생성된 photooxidative products의 전체수율 또한 자외선만을 조사하였을 때 보다 2%의 과산화수소가 포함된 경우가 현저히 높았다. 위와 같은 결과로 자외선을 조사해주는 조건에서는 자외선에 의한 과산화물의 분해가 일차적으로 이루어지고 이로 인해 생성된 라디칼이 DNA base를 공격하는 것으로 반응단계를 알 수 있었다. 그러므로 가해지는 과산화물의 존재량이 매우 중요하다고 할 수 있다. 2% 과산화

수소를 첨가하고 20분간 자외선을 조사한 후, TMS 유도체화 반응을 실시한 후 GC/MS로 분석한 thymine의 photooxidative products의 총 이온 크로마토그램(TIC)을 Fig. 2-2-4에 나타내었다. 약 80%의 thymine이 위 과정에 의하여 손상된 구조로 변형되었으며, 12개의 변형된 thymine구조가 나타났다. Fig. 2-2-4-(A)의 1, 2, 5 그리고 8 피이크들은 각각 TMS유도체화된 thymine, uracil, cytosine 그리고 5-hydroxymethyluracil에 해당한다. 이 피이크들은 대조군을 사용하여 동일한 실험 조건과 기기조건에서 각각의 머무름 시간을 비교하여 검증하였다. 3, 4, 6 그리고 9 피이크들은 각각 유도체화된 5, 6-dihydrouracil, 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 6-hydroxythymine 그리고, carboxyuracil에 해당하며 이들은 문헌에 발표된 자료를 비교하여 검증하였다. 10, 12 피이크는 각각 cis-, trans-thymine glycol에 해당하는 피이크이다 이들은 thymine을 OsO₄를 사용하여 산화시키고 유도체화한 후 생성된 생성물의 피이크들로부터 검증하였는데, 특히 cis-, trans-thymine glycol는 OsO₄ 산화반응에 의해 쉽게 생성되는 물질임이 보고되고 있다.

7, 11 그리고 13 피이크들의 질량스펙트럼을 Fig. 2-2-5에 나타내었다. Fig. 2-2-5-(A)에서분자량이온(M⁺)과 특성이온인 (M-15)⁺이온을 m/z 374 와 359 에서 각각 확인할수 있다. 이는 5-methyl dialuric acid의 TMS유도체에 해당한다. 이 생성물은 대조군인 OsO₄의 산화반응을 통한 생성물 피이크에서도 확인되었다. DNA base중 하나인 cytosine을 OsO₄와 반응시켰을 때, C5-C6 이중결합의 산화와 탈아민 기과정을 통해 형성되는 생성물임이 문헌에 보고된 바 있으므로 thymine의, 경우와 비교할 수 있다. Fig. 2-2-5-(B)와 Fig. 2-2-5-(C)는 질량스펙트럼이 거의 동일하나 머무름 시간이 서로 다른 것으로 구조이성질체임을 알 수 있다. 이들의 분자량 이온 스펙트럼은 나타나지 않았으나 특성이온인 (M-15)⁺ m/z 449 가 관찰되었다. 이 질량스펙트럼에 의해 cis- 및 trans-thymine-N-oxide의 TMS유도체화물로 실험적으로 정의하였으며, 이 스펙트럼들은 thymine glycol의 질량스펙트럼과 거의 유사하다. 이 구조 이성질체들에 대한 정확한 고찰은 차후에 더 이루어져야 할 것이다.

전자충격법(EI)와 화학이온화법(CI)에 의한 손상된 thymine 구조들의 분자량 이온(M⁺)과 특성이온(M-15)⁺ 및 기타 이온들을 Table 2-2-1에 요약하였다. 표에서 나타난 대로 5-hydroxy-5-methylhydantoin과 thymine glycol-N-oxide등과 같은 몇몇 구조들은 분자량이온이 전자충격법으로 검출되지 않았다. 분자량이온을 검출하는 방법으로 전자충격법(EI)보다 연성이온화법인 화학이온화법(CI)이 널리 사용된다. 본 연구에서도 위 두 구조를 화학이온화법(CI)으로 쉽게 검출하였다.

앞서의 Fig. 2-2-4-(A)에서 보는 바와 같이 cis-, trans-thymine glycol, 5-hydroxly-5-methylhydantoin 및 5-methyl dialuric acid가 본 실험조건에서 가장 주된 생성물로 검출되었고, 이 외에 uracil, 5, 6-dihydrothymine, 5-hydroxymethyluracil, 6-hydroxythymine, 5-carboxyuracil등이 본 실험조건에서

검출되었다. 특히 5,6-dihydrothymine은 자외선을 5분간 조사하였을 때 매우 적은 양으로 검출되었다. 따라서 5,6-dihydrothymine은 과산화수소의 존재 하에서는 드물게 생성되며, 자외선의 조사시간이 길어질수록 빠르게 다른 구조로 변이가 일어나는 것으로 생각된다. 또한 hydroxyl radical의 공격에 의해 생성된 5-hydroxymethyluracil, 6-hydroxythymine, 5-carboxyuracil과 같은 생성물들도 자외선의 조사에 따라 쉽게 구조가 파괴되었다.

DNA 내부의 oxidative product를 정량을 위해 DNA로부터 base부분을 분리하는 과정이 필요하다. 이를 위해 formic acid가 널리 사용되는데 formic acid의 영향을 살펴보기 위해 자외선 조사 후 formic acid를 이용하여 가수분해하여 생기는 생성물을 확인하였다. Fig. 2-2-4 (A)와 Fig. 2-2-4 (B)를 비교하여 보면 formic acid 가수분해과정을 거쳤을 때에는 5-hydroxy-5-methylhydantoin의 양이 급격히 감소하였음을 알 수 있다. 이 결과는 기존의 결과와 상반되는 결과로써 매우 흥미로운 결과인데, 5-hydroxy-5-methylhydantoin과 5-hydroxyhydantoin은 각각 5-methyl-5-hydroxy-barbituric acid와 5,6-dihydroxycytosine의 acid-induced 변형구조로 보고된바 있다. 본 연구결과에서는 5-hydroxy-5-methylhydantoin의 양은 formic acid에 의한 가수분해과정에서 구조가 파괴되는 것으로 나타났다. 한편, formic acid 가수분해과정을 거친 후에 5-methyldialuric acid의 양이 증가됨이 나타났으며, uracil과 5,6-dihydrouracil의 양도 미량이지만 formic acid하에서 증가하였다.

더욱 흥미로운 사실은 cis- 및 trans-thymine glycol-N-oxide가 formic acid 가수분해과정을 거친 후에는 검출되지 않았다. 산성조건에서는 이들 생성물이 매우 불안정한 것으로 생각된다.

또 한가지 특이한 결과는, trans-thymine glycol과 cis-thymine glycol의 존재량의 변화양상이다. formic acid가 존재하지 않을 경우에는 trans-thymine glycol이 우세하게 생성되는 것으로 나타났으나, 가수분해과정을 통해 cis-thymine glycol이 더 우세한 것으로 관찰되었다. 따라서 산성의 가수분해조건에서는 trans-thymine glycol의 일부가 cis-thymine glycol로 전환되며, 일부는 가수분해과정에서 구조가 파괴되는 것으로 결론지을 수 있겠다.

과산화수소의 존재 하에서 thymine의 손상된 구조에 대한 위의 질량스펙트럼을 근거하여 구조변이과정을 Fig. 2-2-6에 제시하였다. 주된 변이로는 thymine의 C5-C6 이중결합의 변이를 볼 수 있다. 이 과정의 주 생성물으로써 reduction과 oxidation을 거친 cis- 및 trans-thymine glycol이 생성되었다. 또한, 5,6-dihydrothymine에 두 개의 hydroxyl radical이 추가됨으로써 생성될 수 있다. Thymine으로부터 uracil이 형성되는과정은 직접 methyl기가 떨어짐으로써 생성되지 않고 다소 복잡한 단계를 거치게 된다. 먼저 thymine이 hydroxyl radical의 공격을 받아 5-hydroxymethyluracil로 구조가 변화되며, 다음 단계로 산화과정을 통해 5-carboxyuracil을 형성하게 된다. 최종적으로 carboxyl group이 분리됨으로써

uracil이 형성되는 것으로 추측된다. 6-hydroxythymine은 두 가지 경로로 형성될 수 있다. 한가지는 thymine으로부터 hydrogen radical과 hydroxyl radical의 치환 반응을 통하여, 또 한가지는 thymine glycol로부터 물분자가 떨어져나감으로써 형성될 수 있다. 5-methyldialuric acid는 thymine의 C5-C6 이중결합의 산화반응에 의해 생성된다. OsO₄에 의한 산화반응에서는 매우 적은 양으로 형성되었다.

Cytosine도 위와 마찬가지로 자외선을 20분이 조건에서 몇가지의 photooxidative product들이 관찰되었다.(Fig. 2-2-7) 이들의 구조는 Mass spectrum들의 fragmentation을 해석하여 구조를 확인하였으며(Privat, 1996; Dizdaroglu, 1986; Hong, 1999; Demple, 1980; Simandan, 1996; Wagner, 1996; Dizdaroglu, 1985), 몇몇 구조는 이미 문헌에 밝혀진 자료와 비교하여 확인하였다. 사실상 적당한 내부표준물질의 부재 하에서의 구조확인 은 자칫 잘못된 구조해석을 초래할 수 있다. 그러므로 적절한 산화제를 이용하여 cytosine을 산화시켜서 구조를 확인하는 작업이 필요하다. 본 연구에서는 강력한 산화제인 OsO₄를 사용하여 cytosine을 산화시켜 구조확인에 있어 적절한 대조군으로 사용하였다.

이 경우 생성되는 산화종으로는 uracil, cytosine glycol, uracil glycol, 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracil, 5,6-dihydroxycytosine, 5,6-dihydroxyuracil 등이 생성되었는데 pyrimidine C5-C6 double bond에 oxidation이 발생하고 또한, deamination이 일어난 결과이다. uracil의 경우는 cytosine에 대한 hydroxyl radical의 nucleophilic aromatic substitution과정의 결과이다(Singer, 1983; Caulfield, 1998). 본 연구조건에서도 cytosine의 deamination과 그로 인해 나타나는 다양한 종들이 관찰되었다.

OsO₄에 의해 먼저 cytosine이 먼저 cytosine glycol로 구조변화가 일어나고 이 화합물은 화학적으로 불안정하여 탈수(dehydration)를 거쳐 5-hydroxycytosine으로 급속히 변형된다. Deamination과정에 의해 cytosine glycol로부터 uracil glycol이 형성되는데 위와 같은 과정은 cytosine glycol이 화학적으로 매우 불안정하기 때문인 것으로 생각된다. 5,6-dihydroxycytosine과 5,6-dihydroxyuracil이 형성되었다. 이들은 각각 5-hydroxycytosine과 5-hydroxyuracil로부터 기인한다.

Cytosine이 OsO₄에 의해 산화되었을 때의 특이한 결과로서 5,6-dihydro uracil이 형성되었다. 이는 uracil의 환원종으로 생성되었는데 지난 연구결과에서 thymine이 OsO₄에 의한 결과로 특이하게 5,6-dihydrothymine이 생성된 것과 유사하다(Demple et al., 1980). (Fig. 2-2-8)

Cytosine의 다양한 photooxidative product들의 TMS유도체화 mass spectral data는 uracil glycol과 cytosine glycol을 제외하고는 [M-15]⁺ 이온의 세기가 매우 강하게 나타난다. TMS 유도체화 시에 cytosine, 5-hydroxyuracil, 5-hydroxycytosine, 5,6-dihydroxyuracil, 5,6-dihydroxycytosine등은 enolization으로 aromaticity를 형성함으로써 분자이온(molecular ion, M⁺)이 안정화되기 때문에 이들 이온의 세기가 강하게 나타난다.

Cytosine의 photooxidative product 중에서 5-member ring 구조가 발견되었다. 5,6-dihydrocytosine, 5,6-dihydrouracil, 5-hydroxyhydantoin, 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy imidazolidine은 지난 연구에서 보고된 바 있다.(Dizdaroglu, 1986; Simandan, 1996; Wagner, 1996) 5,6-dihydrocytosine, 5,6-dihydrouracil은 그들의 높은 $[M-15]^+$ 값으로부터 쉽게 구조가 확인되어 진다. 5-hydroxyhydantoin의 TMS유도체화된 mass spectrum은 5-hydroxy-5-methylhydantoin과 유사한 스펙트럼 경향을 나타내는데 분자이온 $[M]^+$ 과 $[M-15]^+$ 값이 매우 약하게 나타난다.(Hong, 1999) 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine-N,0-(TMS)₄는 molecular ion의 약한 감응정도를 제외한 5-membered 변형구조의 mass spectrum을 도시하였다. 인접한 두 개의 TMS그룹의 효과에 이인한 m/z 147 $[(CH_3)_2Si=OTMS]^+$ peak가 특징적으로 높은 감응정도를 나타내는 것이 관찰되었다. 2-oxo-5hydroxy imidazol은 $[M-15]^+$ 값으로 구조분석이 용이하였고 $[(CH_3)_2Si=O-CH=CH-OTMS]^+$ 에 의한 $m/z = 189$ peak가 Fig. 2-2-9의 (C), (D)에서 관측되었는데 이 이온은 C4-C5의 oxidation에 대한 확인이온으로 사용된다. 이 이온의 존재에 의해서 각각 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine, 3-amino-4,5-dihydroxy pyrazole, 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy imidazolidine 구조를 추정하였다. 특히 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine는 $[M-CONHTMS]^+$ 가 $m/z=334$ 로 나타났다. 이 이온의 세기가 강한 것은 carbamoyl기를 가지고 있는 화합물임을 증명해주는 peak가 된다. 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy imidazolidine과 5-hydroxy hydantoin은 본 연구에서 CI법에 의해 molecular ion을 보다 수월하게 확인할 수 있었다(Foiles, 1991).

손상된 DNA의 구조를 규명해 내는데 있어서 DNA의 염기들을 분리해 내기 위해 formic acid에 의한 hydrolysis과정이 주로 사용되어진다(Douki, 1996). 이 경우 가수분해 과정에서도 몇몇 oxidative product들이 생성되어 질 수 있다. 이 영향을 알아보기 위해 cytosine의 산화과정 전에 hydrolysis 과정을 첨가하여 실험을 하였다. 결과를 Fig. 2-2-10에 도시하였는데, 변형구조들의 생성정도가 구조에 따라 formic acid에 의해 영향을 받고 있음을 알 수 있다. Uracil glycol과 5,6-dihydroxycytosine는 현저하게 생성량이 줄어들었으며, 5-hydroxyuracil, 5,6-dihydroxyuracil은 formic acid에 의한 가수분해 단계에서 생성량이 증가되었음을 알 수 있다. 특히 uracil glycol의 경우 산성조건에서는 구조가 불안정하므로 급속히 5-hydroxyuracil로 구조변화가 일어남을 알 수 있다. 유사한 반응으로 산성조건 하에서 cytosine도 급격히 구조변화가 일어난다(Dizdaroglu, 1985). 이 경우 dehydration과정을 거쳐서 5-hydroxycytosine으로 구조변화가 일어나며, deamination과 dehydration을 거쳐서 5-hydroxyuracil로 변화가 일어난다. 이 과정은 문헌에 의해 이미 검증된 바 있다(Taguchi, 1977; Teoule, 1978). 5,6-dihydrocytosine의 양은 formic acid 가수분해 후에 감소된 것이 관찰되었으며

반대로 5,6-dihydrouracil은 증가되었다. 이와 같은 고찰에 의해 formic acid에 의한 가수분해과정은 cytosine 유도체종들의 deamination과정의 반응속도를 증가시키는 것을 알 수 있다. 5-membered 구조의 경우 5-hydroxyhydantoin의 경우 양의 증감이 나타나지 않았으나, 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine의 경우에는 양이 감소되었는데, 이는 산성조건에서의 carbamate그룹의 불안정성 때문인 것으로 생각된다.

위와 같은 결과에 의거하여 Fig. 2-2-11에 cytosine의 photooxidation pathway를 제안하였다. 가장 먼저 cytosine의 C5-C6 double bond가 깨지면서 oxidation이 일어나고 그 결과 cytosine glycol이 형성된다. Cytosine glycol은 화학적으로 불안정하므로 dehydration을 거치면서 구조의 분해가 일어나 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracil, uracil glycol이 형성되고 deamination과정을 통해서 5,6-dihydroxyuracil, 5,6-dihydrouracil이 형성된다. C5-C6 double bond reduction에 의해서 5,6-dihydrocytosine이 형성되며 C5-C6 double bond oxidation에 의해 cytosine glycol로 변환된다. Deamination에 의해 5,6-dihydrouracil로 변환된다.

5-hydroxytosine의 생성은 두가지로 설명할 수 있다. 첫째는 5-hydroxycytosine이 cytosine glycol로부터 생성되는 것이고, 둘째는 cytosine의 C5위치에 hydroxyl radical의 직접적인 결합에 의해 생성되는 것이다. 5,6-dihydroxycytosine의 형성은 5-hydroxycytosine이 더 산화된 결과이다. 나아가 5,6-dihydroxycytosine로부터 CO 분자의 손실은 3-amino-4,5-dihydroxypyrazole의 형성을 유도한다.

5-hydroxyhydantoin의 형성은 dialuric acid로부터 CO 분자가 제거됨으로써 이루어질 수 있다. 지난 연구결과에서 5-methyldialuric acid가 thymine의 산화반응의 결과로 형성되며 이는 5-hydroxy-5-methyl hydantoin형성의 전구체임이 밝혀졌다. 따라서 유사한 반응경로로 5-hydroxyhydantoin은 dialuric acid로부터 CO 분자가 떨어져나감으로 형성된다고 볼 수 있다. 5-hydroxyhydantoin의 dehydroxylation과 hydrogenation에 의해 각각 hydantoin과 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine이 각각 생성된다. 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine에서 dehydration과정을 거치면서 2-oxo-5hydroxyimidazole이 형성된다. 일반적으로 사람의 간에서의 pyrimidine 대사과정에 의해 carbamoyl group이 형성된다. (Loffler, 1990) 이는 cytosine의 photooxidative product로 carbamoyl group이 생성될 수 있음을 뒷받침 해주며 본 연구에서는 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine로부터 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy imidazolidine이 형성된다.

최종적으로 시판중인 calf thymus DNA에 UV를 조사하고 그에 따른 변형 DNA base들의 생성여부를 살펴본 결과를 Fig. 2-2-12에 나타내었다. UV조사 시간은 앞서의 연구결과를 토대로 20분으로 설정하였고 반응을 시키고 난 후에는 88% formic

acid로 가수분해하여 base만을 분리해 내었고 이를 TMS 유도체화 하여 GC/MS로 분리분석하여 질량스펙트럼을 비교하여 변형염기여부를 결정하였다. Hydroxyl radical 용액 하에서 각각의 base 경우에서 알아본 변형염기들이 나타났으며 생성 정도에는 약간의 차이를 보이고 있으나, cytosine의 경우 라디칼 공격과 탈아민기 반응, 탈수화 반응된 변형구조가 관찰되고 있다.

실제 DNA chain을 변형시킨 이 실험에서 thymine과 cytosine 각각의 실험에서 나타났던 몇몇 5-member ring 구조는 나타나지 않았다. 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine, 3-amino-4,5-dihydroxypyrazole, 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine 그리고 2-oxo-5-hydroxyimidazole 등이 관찰되지 않았는데 이들은 3-amino-4,5-dihydroxypyrazole로부터 기인된다고 앞서의 본 실험팀의 연구결과에서 제안한바 있으나, 이 경우에는 이 중간체가 생성되지 않았으므로 나타나지 않았다. 5,6-dialluricacid와 5,6-dihydroxycytosine 역시 생성되지 않았다. 8-hydroxyadenine과 8-hydroxyguanine 그리고 Fapy-adenine은 본 실험에서 전형적인 photooxidative products로 나타났으며 5-hydroxycytosine 의 탈아민기 반응산물인 5-hydroxyuracil도 본 반응조건에서 높은 감응정도로 질량스펙트럼에 의해 확인되었으며 5,6-dihydrouracil 및 thymine glycol 변형염기도 본 실험조건에서 관찰되었다. 본 결과에 대한 각 염기들의 머무름 시간과 특성질량 피이크들을 Table 2-2-3에 정리하였다.

라. 결론

이상의 연구결과로부터 과산화수소의 존재 하에서 자외선조사에 의한 DNA base 들의 photooxidative products의 deamination 과정을 수반한다는 것을 확인하였으며, purine N7-C8, pyrimidine C5-C6 double bond에 hydroxyl radical이 직접적으로 부가됨으로써 형성된다. 특히 formic acid 가수분해과정은 몇몇 photooxidative products의 deamination 반응속도를 증가시키는 것을 알 수 있었다. 자외선조사에 의해서 각 염기별로 다양한 변형염기구조들이 생성되었으며, 이 과정은 실제 생체 내에서의 실제 형성량과는 많은 차이가 있다고 본다. 시판중인 실제 DNA chain을 이용한 실험을 통해 uracil glycol, thymine glycol이 주된 변형 염기구조로 나타났고 Fapy-guanine은 관찰되지 않아 실제 본조건에서 생성이 난해한 것으로 나타났다.

위와 같은 연구를 수행함에 있어서 GC/MS법은 매우 효과적인 분석방법이 될수 있다. 특히 TMS 유도체화 된 생성물들은 매우 훌륭한 기체 크로마토그래피적 성질을 나타내고, 특징적인 질량 스펙트럼을 제공하므로 이를 통해 분석감도를 증가시켜 보다 최적의 분석상태를 유지할 수 있었다. 이를 바탕으로 GC/MS법은 hydroxyl radical에 기인된 손상된 DNA자체의 구조규명연구에도 큰 기여를 할 것으로 판단된다.

마. 참고 문헌

- Adachi, S.; Zeisig, M.; Moller, L. , (1995), *Carcinogenesis* 16, 253-258.
- Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Gajewski, E.; Dizdaroglu, M. (1991),
Biochem. J. 273, 601-604.
- Bulychev, N. V.; Varaprasad, C. V.; Dorman, G.; Miller, J. H.; Eisenberg, M.;
Grollman, A. P.; Johnson, F. (1996), *Biochemistry* 35, 13147-13156.
- Caulfield, J. L.; Wishnok, J. S. Tanabaum, S. (1998), *J. Biol. Chem.* 273,
12689-12695.
- Cheng, K. C.; Cahill, D. S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L.A. (1992),
J. Biol.Chem. 267, 166-172.
- Crain, P.F. (1990), *Mass Spectrom. Rev.* 9, 505.
- Demple, B.; Linn, S. (1980), *Nature* 287, 203-208.
- Devasagayam, T. P. A.; Steenken, S.; Obendorf, M. S. W.; Schultz,
W.A.; Sies, H. (1991), *Biochemistry* 30, 6283-6289.
- Dizdaroglu, M.; Holwitt, E.; Hagan, M.P.; Blakely, W.F. (1986), *Biochem. J.*
235, 531-536.
- Dizdaroglu, M. (1993), *FEBS Lett.* 315, 1-6.
- Dizdaroglu, M. (1985), *Anal. Biochem.* 144, 593-603.
- Douki, T.; Delatour, T.; Paganon, F.; Cadet, J. (1996), *Chem. Res.*
Toxicol. 9, 1145-1151.
- Floyd, R. A.; West, M. S.; Eneff, K. L.; Hogsett, W. E.; Tingey, D.
T. (1988), *Arch. Biochem. Biophys.* 262, 266-272.
- Foiles, P. G.; Akerkar, S. A.; Carmella, S. G.; Kagan, M.; Stoner,
G. D.; Resau, J. H.; Hecht, S. S. *Chem. (1991), Res. Toxicol.* 4, 364-368.
- Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. (1995), *DNA Repair and*
Mutagenesis ASM press, Washington D.C.
- Henle, E. S.; Luo, Y.; Gassmann, W.; Linn, S. (1996), *J. Biol. Chem.* 271,
21177-21186.
- Hong, J.; Kim, D. G.; Yoo, J. S.; Cheong, C. (1999), *Microchem. J.* 63,
109-118.
- Hong, J.; Oh, C.-H.; Johnson, F.; Iden, C. R. (1998), *Anal. Biochem.* 261,
57-63.
- Kasai, H.; Crain, P.F.; Kuchino, Y.; Nishimura, S.; Ootsuyama, A.; Tanooka, H.
(1986), *Carcinogenesis* 7, 1849-1851.
- Kenedy, L. J.; Moore, K.; Jr., Caulfield, J. L.; Tannenbaum, S.
R.; Dedon, P. C. (1995), *Chem. Res. Toxicol.* 10, 386-392.

- Lidahl, T.; Nyberg, B. (1974), *Biochemistry* 13, 3405-3410.
- Loffler, G.; Petrides, P. E. (1990), *Physiologische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 517.
- Martini, M.; Termini (1997) *J. Chem. Res. Toxicol.* 10, 234-241.
- Mccloskey (1985), .J.A. in *Mass Spectrometry in Health and Life Sciences* (Burlingame, A.L. & Castagnoli, N., Ed.), Elsevier, Amsteldam, pp 5-21.
- Moriya, M. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1122-1126.
- Nackerdien, Z.; Olinski, R.; Dizdaroglu, M. (1992), *Free Radical Res. Commun.* 16, 259-273.
- Privat, E.; Sowers, L. C. (1996), *Chem. Res. Toxicol.* 9, 745-750.
- Ravanat, J. -L.; Cadet, J. *Chem. Res. Toxicol.*, (1997), 8, 379-388.
- Richter, C.; Park, J.-W.; Ames, B. N. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467.
- Shigenaga, M. K.; Aboujaoude, E. N.; Chen, Q.; Ames, B. N. (1994), *Methods in Enzymol.* 234, 16-32.
- Simandan, T.; Sun, J.; Dix, T. A. *Biochem. J.*, (1998), 335, 233-240.
- Singer, B.; Grunberger, D. (1983), *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens* pp 19-22, Plenum, New York.
- Taguchi, H.; Hahn, B. S.; Wang, S. B. (1977) *J. Org. Chem.* 42, 4127-4131.
- Teoule, H.; Cadet J. (1978) *Effects of Ionizing Radiation on DNA* (Huttermann, J.; Kolhnlein, R., eds) , Springer-Verlag, Berlin, pp. 171-203.
- Teixeira, A. J. R.; Ferreira, M. R., van Dijk, W .J.; van de Werken, G.; deJong, A.P.J.M. (1995), *Anal. Biochem.* 226, 307-319.
- von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, New York.
- Wagner, J. R.; Blount, B. C.; Weinfield, M. (1996), *Anal. Biochem.* 233, 76-85.
- Yakes, F. M.; Van Houten, B. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 514-519.
- Zharkov, D. O.; Rieger, R. A.; Iden, C. R.; Grollman, A. P. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 5335-5341.
- Zuo, S.; Boorstein R. J.; Teebor, G. W. (1995), *Nucleic Acids Res.* 23, 3239-3243.

Table 2-2-1. Chromatographic and mass spectral data for photolytical transformation products of thymine.

TABLE I Chromatographic and Mass Spectral Data for Photolytical Transformation Products of Thymine				
Pyrimidine	RT (min)	M ⁺ (m/z)	Characteristic ion	
			EI	CI
Thymine	9.46	270	270(72), 255(100)	271(78), 255(100), 299(25)
5,6-Dihydrothymine	9.57	272	272(100), 257(78), 147(68)	273(100), 257(89)
Uracil	10.10	256	256(100), 255(72), 241(48)	257(100), 241(42), 285(12)
5,6-Dihydrouracil	10.24	258	258(78), 243(100)	259(63), 243(100)
5-Hydroxy-5-methylhydantoin	10.40	346	331(89), 287(100), 144(72), 147(48)	347(48), 331(100), 257(28)
5-Hydroxyuracil	11.19	344	344(41), 329(100), 277(32)	345(72), 329(100), 323(18)
6-Hydroxythymine	11.22	358	358(28), 343(100), 228(20)	359(28), 343(100)
5-Methyldialluric acid	11.33	374	374(20), 359(100), 259(41), 216(32), 144(50)	375(46), 359(100), 403(23)
5-Hydroxymethyluracil	11.39	358	358(42), 343(100), 255(68)	359(46), 343(100)
5-Carboxyuracil	11.93	372	372(6), 357(27), 255(100)	373(12), 357(100)
<i>cis</i> - and <i>trans</i> -thymine glycol	12.37 12.63	448	448(31), 433(40), 343(28), 259(100), 147(28)	449(62), 433(100), 477(21)
<i>cis</i> - and <i>trans</i> -thymine glycol- N-oxide	12.49 12.67	464	449(8), 359(100), 317(20), 259(17), 244(20)	465(8), 449(100), 359(16)

Table 2-2-2. Chromtographic and mass spectral data for photolytical transformation products of cytosine.

Compounds	RT(min)	M ⁺ (m/z)	Characteristic ion
Uracil-(OTMS) ₂	9.04	256	256(100), 257(72), 147(51)
5,6-Dihydrocytosine-N,O-(TMS) ₂	9.60	257	257(100), 242(98), 143(52), 100(97)
Hydantoin-(OTMS) ₂	9.74	244	244(47), 229(100), 147(94), 73(29)
OP1-N,O-(TMS) ₃	10.14	316	316(100), 301(46), 259(21), 147(32)
5,6-Dihydrouracil-(OTMS) ₂	10.32	258	258(21), 243(48), 215(15), 100(100)
5-Hydroxyhydantoin-(OTMS) ₃	10.57	332	332(2), 317(100), 202(16), 189(21), 147(44)
Cytosine-N,O-(TMS) ₂	10.69	255	255(52), 254(97), 240(100), 168(11), 147(10)
5-Hydroxyuracil-(OTMS) ₃	11.21	344	344(68), 329(100), 270(12), 241(19), 147(10)
OP2-N,O-(TMS) ₄	11.27	406	406(82), 391(100), 317(45), 291(64), 217(22)
OP3-N,O-(TMS) ₄	11.61	403	403(100), 388(17), 331(23), 189(100), 147(93)
Dialuric acid-(OTMS) ₃	11.72	360	360(21), 345(100), 303(25), 147(18)
Uracil glycol-(OTMS) ₄	11.80	434	434(18), 419(23), 245(100), 147(21)
Cytosine glycol-N,O-TMS ₄	11.89	433	433(21), 405(11), 331(100), 309(12), 147(19)
5-Hydroxycytosine-N,O-(TMS) ₃	11.98	343	343(61), 328(100), 269(12), 254(14), 240(11)
5,6-Dihydroxyuracil-(OTMS) ₄	12.41	432	432(72), 417(100), 343(21), 329(19), 147(45)
OP4-N,O-(TMS) ₄	12.54	449	449(1), 434(100), 334(91), 319(34), 305(24), 244(35), 217(20), 189(22), 147(34)
5,6-Dihydroxycytosine-N,O-(TMS) ₄	12.95	431	431(92), 416(100), 342(29), 327(15), 147(12)

OP1: 2-oxo-5-hydroxyimidazole OP2: 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine, OP3: 3-amino-4,5-dihydroxypyrazole OP-4: 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine

Table 2-2-3. Chromatographic and mass spectral data for photolytical transformation products of calf thymus DNA.

Oxidative products	RT (min)	M+	Charateristic ions
Thymine	9.828	270	270(72), 255(100)
5,6-dihydrothymine	10.263	272	272(100), 257(78)
Uracil	10.416	256	256(100), 255(72), 241(48)
5,6-dihydrouracil	10.568	258	258(78), 243(100)
5-hydroxy-5-methylhydantoin	10.699	346	331(89), 287(100), 144(72)
Cytosine	10.939	255	255(57), 254(97), 240(100), 168(147)
5-hydroxyuracil	11.440	344	344(68), 329(100), 270(12)
5-methylidialuric acid	11.592	374	374(20), 359(100),
5-hydroxymethyluracil	12.071	358	358(100), 343(51), 331(10), 316(8)
Thymine glycol	12.616	448	448(31), 433(40), 343(28), 259(100)
	12.834		
Fapy-adenine	13.531	369	369(5), 354(5), 264(100), 279(30)
Adenine	13.618	279	279(92), 264(100), 192(30), 206(15)
Thymine glycol acid	13.749	564	564(10), 549(20), 259(100), 375(18)
8-hydroxyadenine	14.293	367	367(98), 352(100), 294(10),
2-hydroxyadenine	14.968	367	367(72), 352(100), 147(50)
Guanine	15.230	367	367(90), 352(100), 264(10), 315(12)
8-hydroxyguanine	15.731	455	455(100), 440(50), 352(17), 299(25)

Photolytical transformation of adenine in the presence of H₂O₂

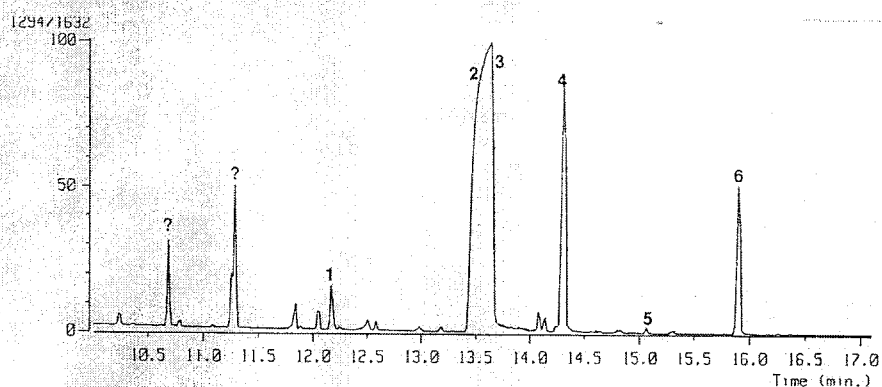
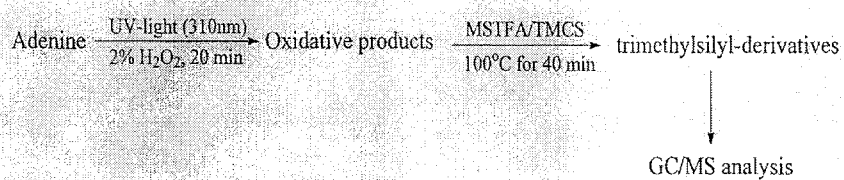


Fig. 1. Total ion chromatogram of photolytical transformation products obtained from UV-irradiation of adenine in the presence of H₂O₂.

peak identity as follows: 1. 2,3,6-trihydroxy-pyrimidine-(TMS)₃ 2. Fapy-adenine-(TMS)₃

3. adenine-(TMS)₂ 4. 8-hydroxyadenine 5. 2-hydroxyadenine-(TMS)₃

6. 2,6-diaminopurine-(TMS)(internal standard)

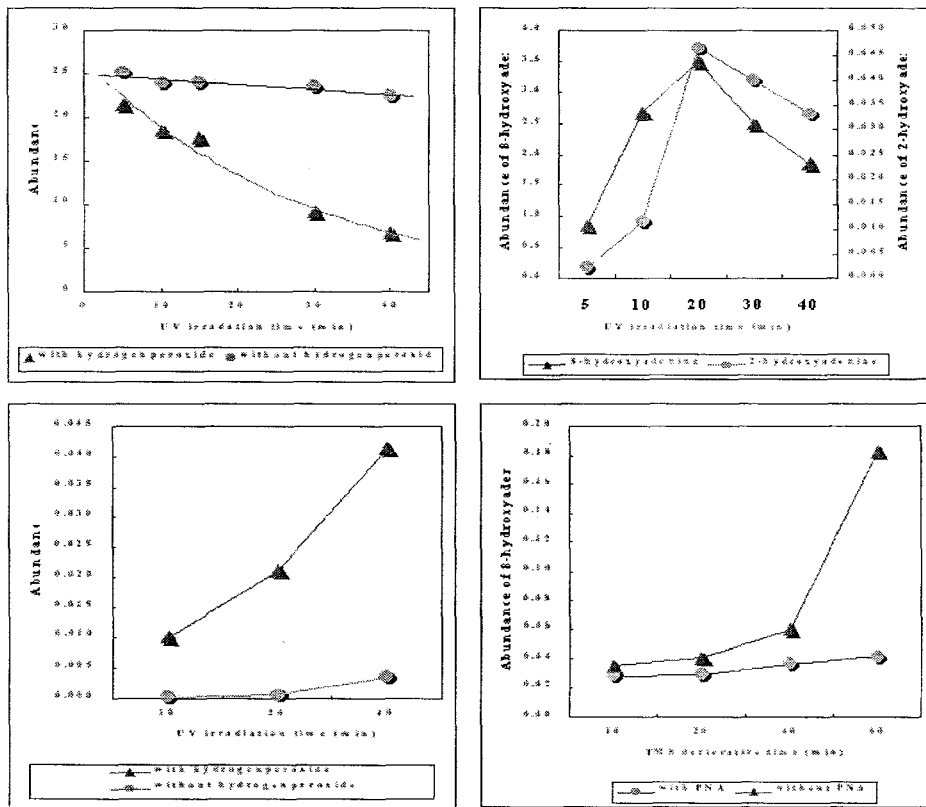


Fig. 2. Time course plot of adenine under UV-irradiation

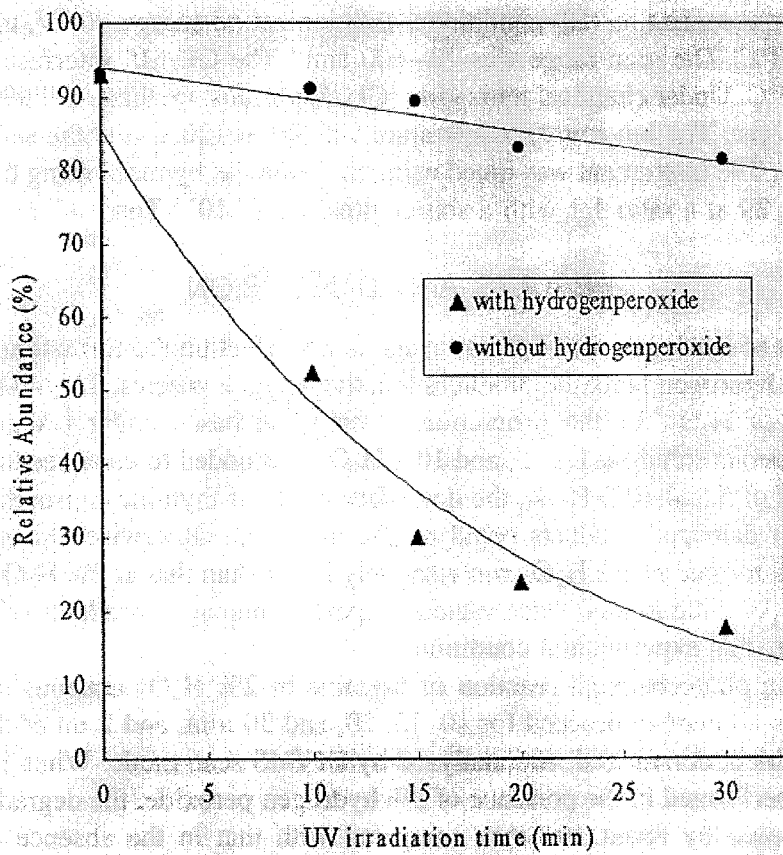


Fig. 2-2-3. Time course plot of thymine under UV-irradiation in the presence of 2% H₂O₂ and the absence of hydrogen peroxide solution.

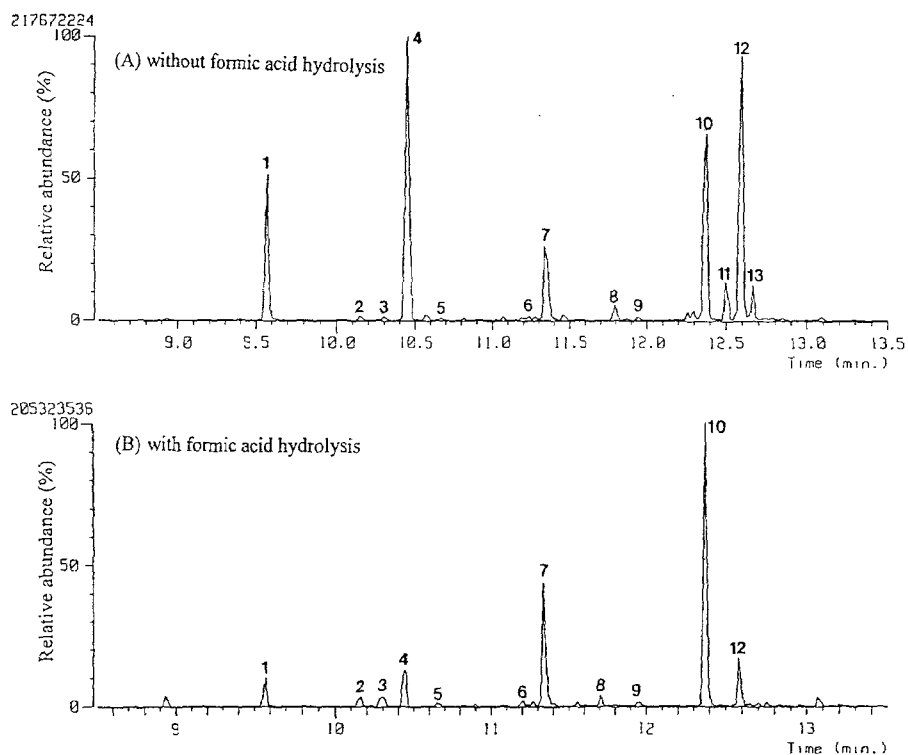


Fig. 2-2-4. Total ion chromatograms of photolytically damaged products obtained from UV-irradiation of adenine in the presence of H_2O_2 . (A) without formic acid hydrolysis (B) with formic acid hydrolysis

peak identification; 1. thymine 2. uracil 3. 5,6-dihydrouracil 4. 5-hydroxy-5-methylhydantoin 5. cytosine 6. 6-hydroxythymine 7. 5-methylthialuric acid 8. 5-hydroxymethyluracil 9. carboxyuracil 10. cis-thymine glycol 11. cis-thymine glycol-N-oxide 12. trans-thymine glycol 13. trans-thymine glycol-N-oxide

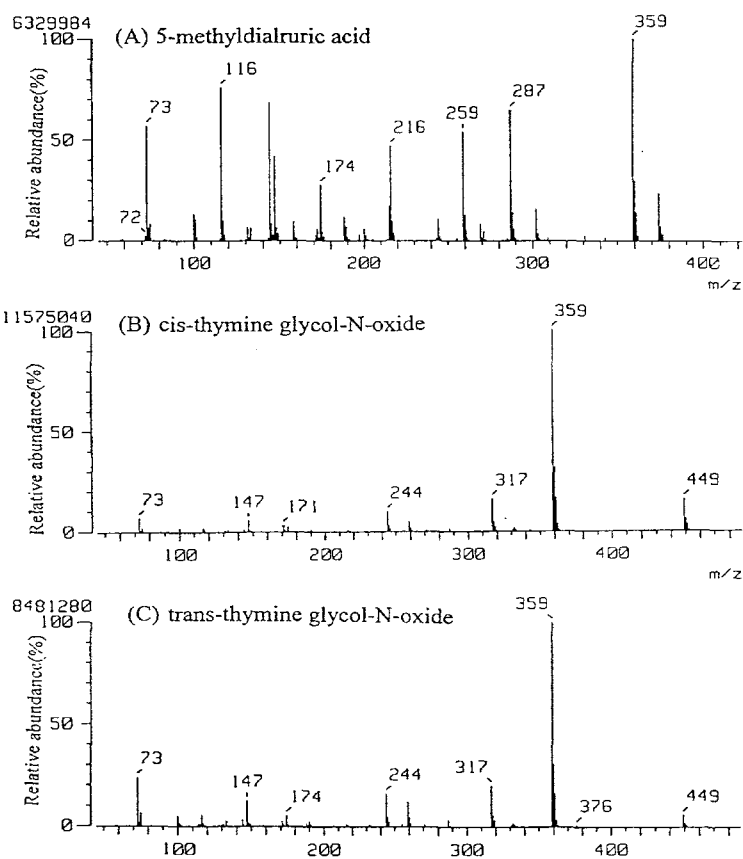


Fig. 2-2-5. EI mass spectra of (A) 5-methylthiouric acid (B) cis-thymine glycol-N-oxide (c) trans-thymine glycol-N-oxide formed from UV-irradiation of thymine in 2% H₂O₂.

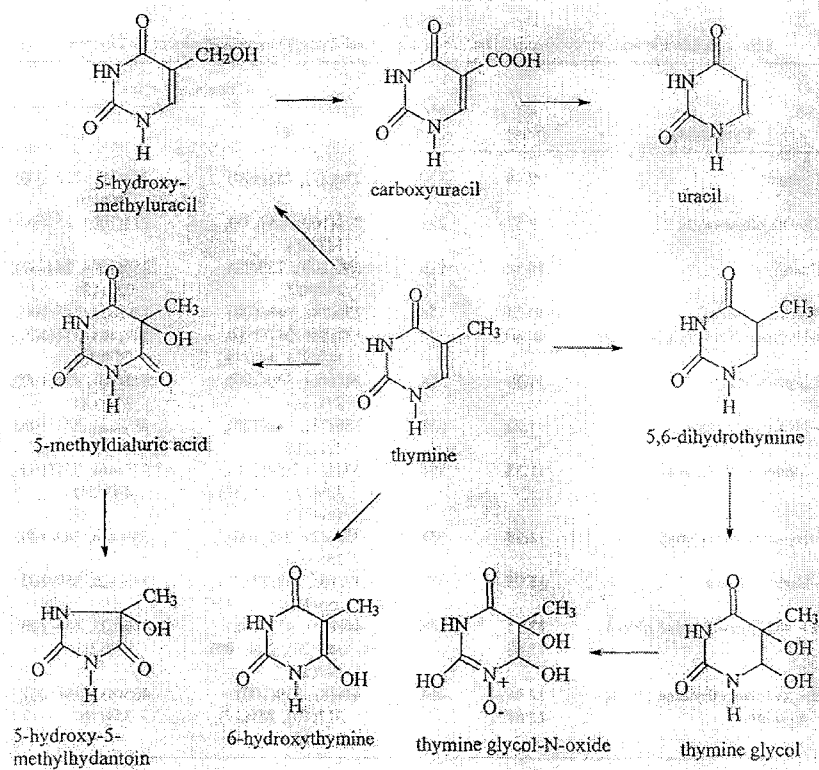


Fig. 2-2-6. Proposed pathways of formation of modified products from UV-irradiation of thymine in 2% H₂O₂ solution.

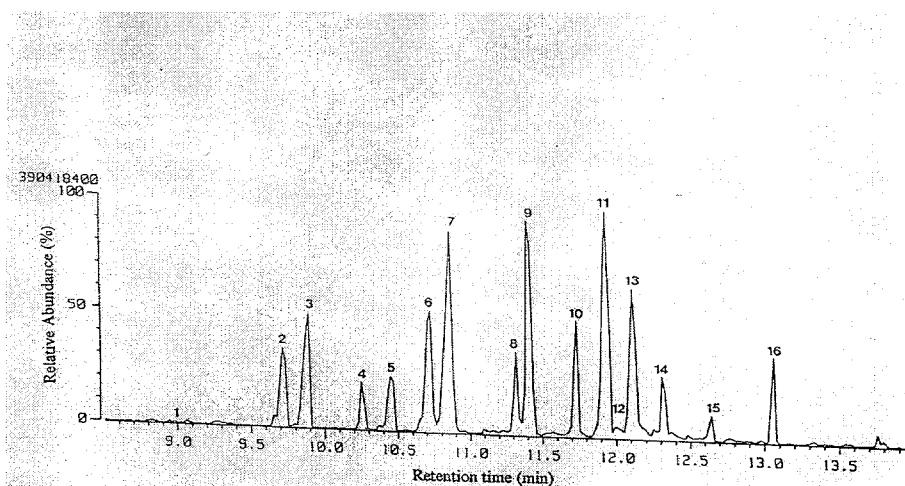


Fig. 2-2-7. Total ion chromatogram of photolytically damaged products obtained from UV-irradiation of cytosine for 20 min in 2% H₂O₂ solution.
 peak identification : 1. uracil-(OTMS)₂, 2. 5,6-dihydrocytosine-N,O-(TMS)₂ 3. hydantoin-(OTMS)₄ 4. 2-oxo-hydroxyimidazole-N,O-(TMS)₃, 5. 5,6-dihydrouracil-(OTMS)₂ 6. 5-hydroxyhydantoin-(OTMS)₃ 7.cytosine-N,O-(TMS)₂ 8. 5-hdroxyuracil-(OTMS)₃ 9. 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine-N,O-(TMS)₄, 10. 3-amino-4,5-dihydroxypyrazole-N,O-(TMS)₄ 11.uracil glycol-(OTMS)₄ 12.cytosine glycol-N,O-(TMS)₄ 13. 5-hydroxycytosine-N,O-(TMS)₄ 14. 5,6-dihydroxyuracil-(OTMS)₄ 15. 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxy-imidazolidine-N,O-(TMS)₄ 16. 5,6-dihydroxycytosine-N,O-(TMS)₄

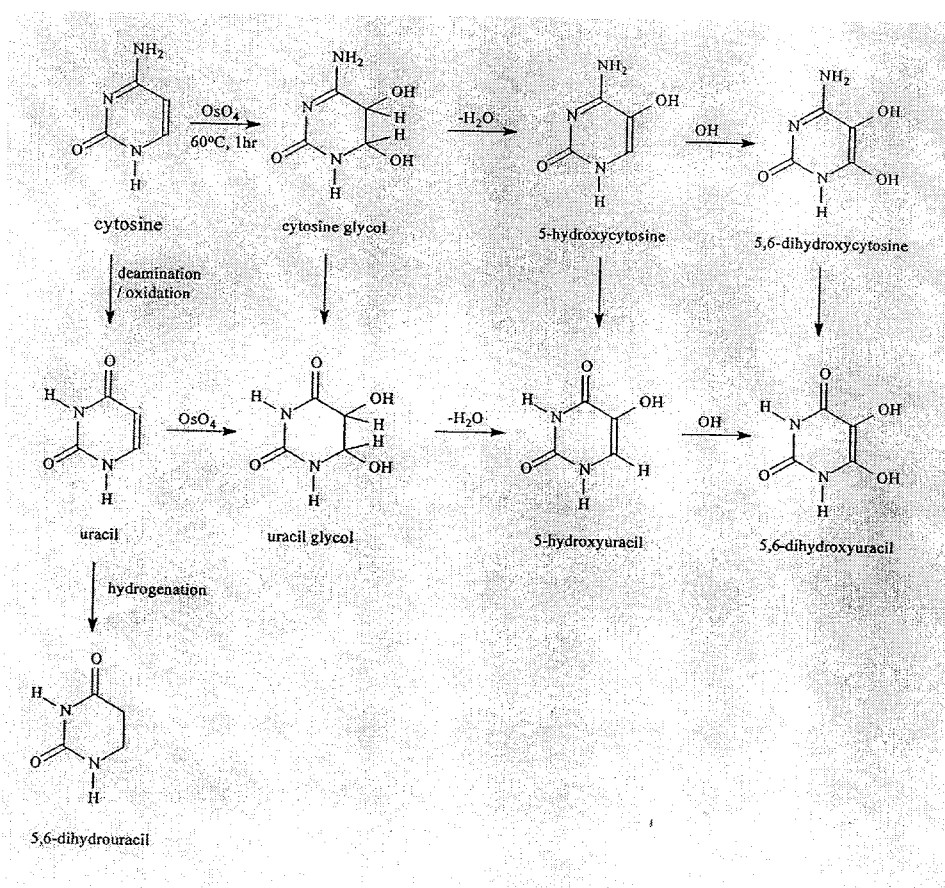


Fig. 2-2-8. Reaction products formed from OsO₄ treatment of cytosine

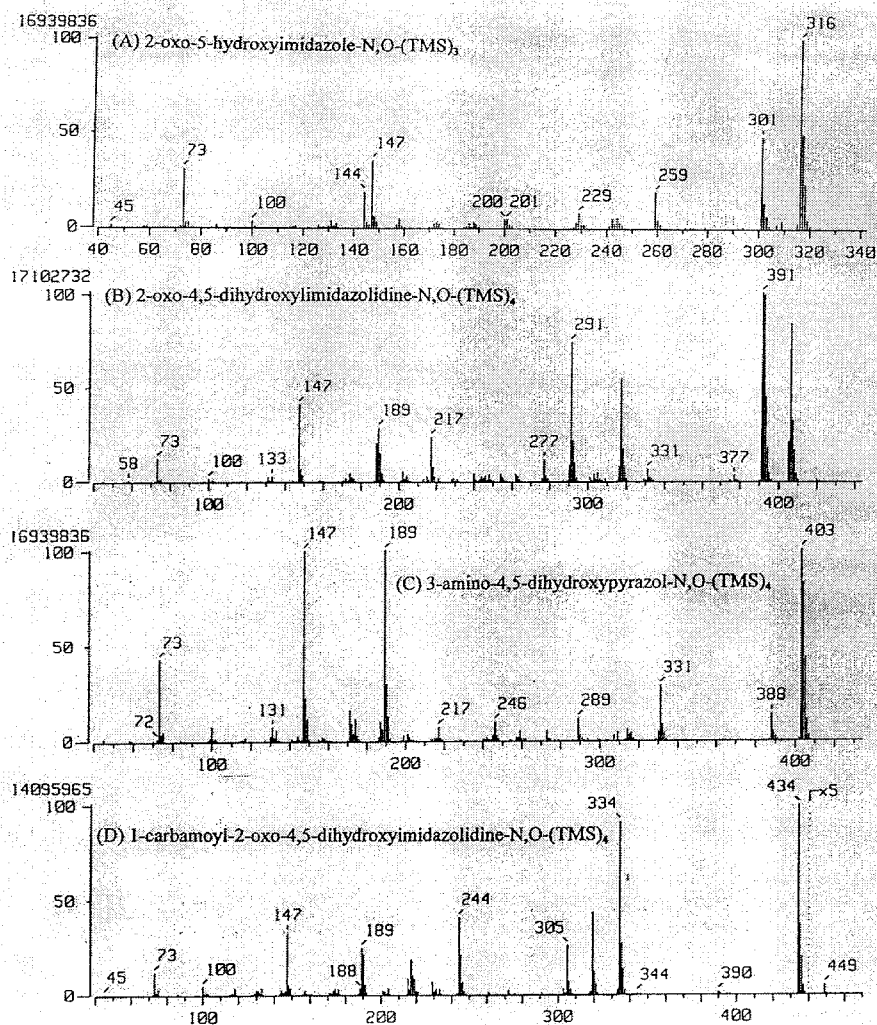


Fig. 2-2-9. EI mass spectra of (A) 2-oxo-5-hydroxyimidazole-N,O-(TMS)₃, (B) 2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine-N,O-(TMS)₄, (C) 3-amino-4,5-dihydroxypyrazol-N,O-(TMS)₄, (D) 1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine-N,O-(TMS)₄ formed from UV-irradiation of cytosine in 2% H₂O₂ solution.

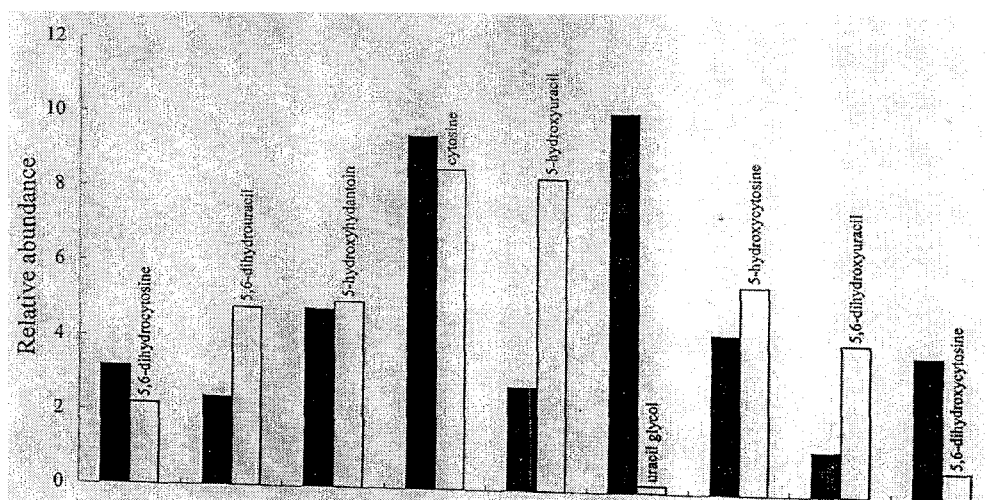


Fig. 2-2-10. Relative abundance of modified products formed from UV-irradiation of cytosine in 2% H₂O₂ solution. Dark column, without formic acid hydrolysis; light column, with formic acid hydrolysis.

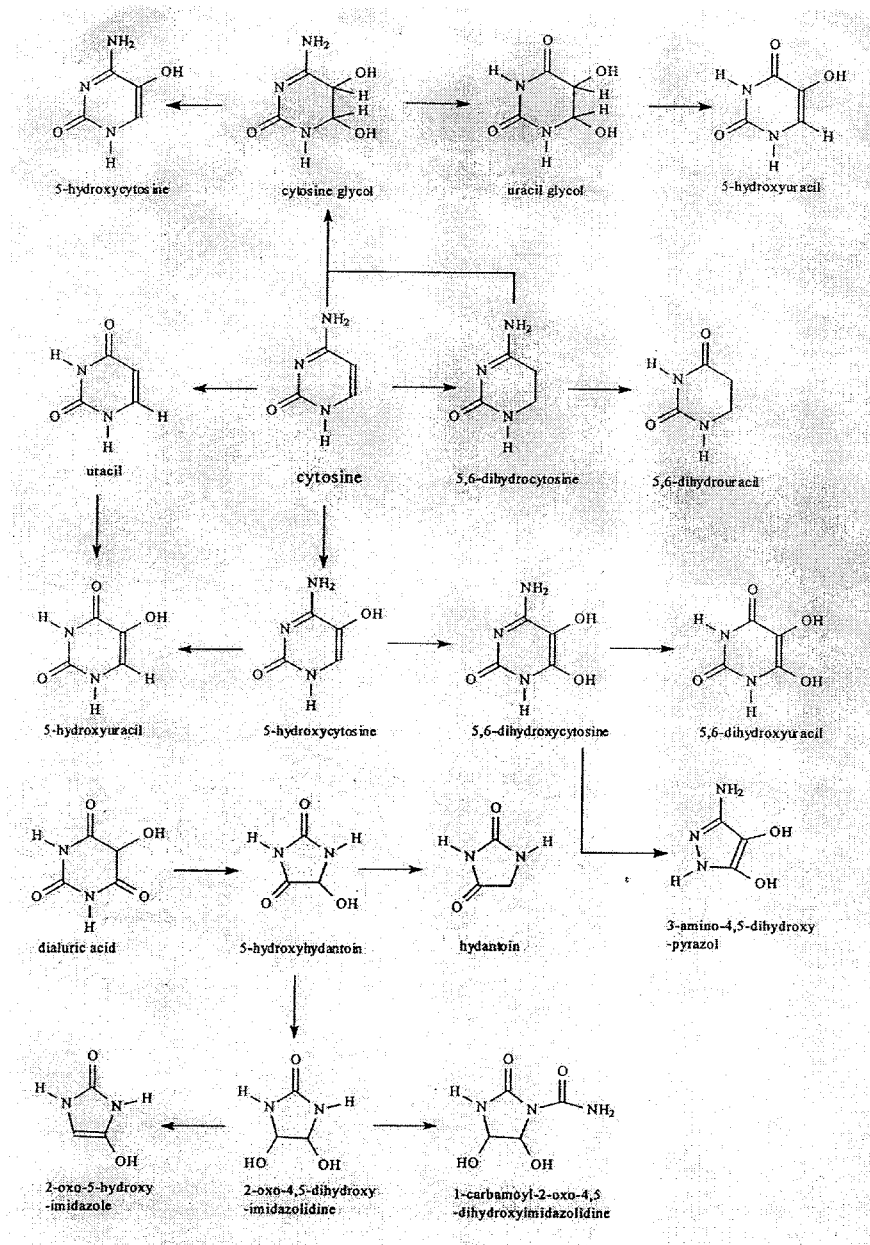


Fig. 2-2-11. Proposed pathways of formation of modified products from UV-irradiation of cytosine in the presence of 2% H₂O₂ solution.

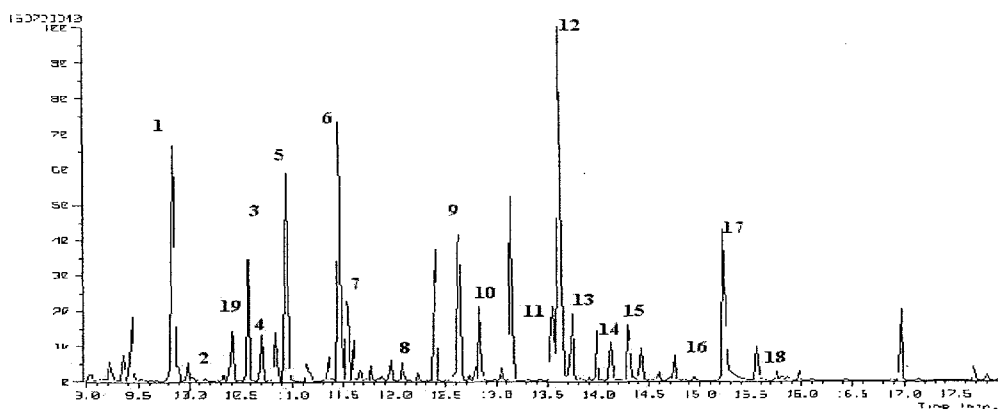


Fig. 2-2-12. Photooxidative products of DNA bases from Calf Thymus DNA under UV-irradiation with hydroxyl radical.

Peak identification : 1. thymine 2. 5,6-dihydrothymine 3. 5,6-dihydrouracil 4. 5-hydroxy-5methylhydantoin 5. cytosine 6. 5-hydroxyuracil 7. 5-methylalaluric acid 8. 5-hydroxymethyluracil 9., 10. thymine glycol 11. Fapy-adenine 12. adenine 13. thymine glycol acid 14. Fapy-guanine 15. 8-hydroxyadenine 16. 2-hydroxyadenine 17. guanine 18. 8-hydroxyguanine 19. uracil

제3절 인플루엔자 바이러스 RNA 구조

1. 서론

Influenza A virus는 orthomyxoviridae family에 속하며 그 genome은 8개의 negative-sense single-stranded RNA 분자로 구성된다. 이 8개의 RNA는 세 개의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 단백질 PA, PB1, PB2와 nucleoprotein NP 등 모두 10개의 단백질을 encoding한다. Viral genome의 전사와 복제는 감염된 세포의 핵 내에서 세 개의 RdRp와 NP, 그리고 viral RNA (vRNA)로 이루어진 ribonucleoprotein (RNP) complex에 의해 수행된다. 복제의 과정을 통하여 vRNA로부터 positive-sense의 full-length cRNA가, 그리고 cRNA로부터 vRNA가 만들어진다. 전사 또한 같은 RNP complex에 의해 수행되지만, 복제와 달리 host mRNA의 7-methyl guanosine cap 구조에 의해 initiation 되며 cRNA보다 15~22개 짧은 mRNA가 만들어지며 poly(A) tail이 생성된다는 점이 다르다.(Lamb & Choppin, 1983)

Influenza A virus의 RdRp는 RNA의 5' 말단과 3' 말단에 의해 이루어지는 partial duplex promoter를 인식하여 결합한다. 이 부위는 소위 panhandle RNA라고도 불린다. 이 panhandle RNA는 influenza A virus의 변이체들 중에서 염기서열이 보존되는 특이한 부위이다.(Fig. 3-1A 참조) 이 promoter 부위는 복제와 genome packaging에 필요한 모든 신호를 포함하고 있는 것으로 보인다.(Luytjes, 1989) 또한 이 부위는 전사의 initiation(Fodor, 1994; Fodor, 1995; Cianci, 1995; Hagen, 1994)과 termination, 그리고 polyadenylation(Poon, 1998; Pritlove, 1998)의 regulation에 관여한다는 몇 가지 증거가 보고되었다. RdRp는 RNA를 template로하여 바로 RNA를 합성하는 효소로서 대부분 virus에서 gene이 발견된다. RdRp의 이런 특이한 성질에도 불구하고 RdRp의 RNA 합성 및 promoter 인식 기작에 대하여서는 아직까지 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 RdRp가 인식하는 promoter인 소위 panhandle RNA의 구조를 규명함으로써 promoter와 RdRp의 상호작용 및 기작에 대한 인식에 기여를 하고자 하였다. Panhandle RNA의 염기서열은 NMR 구조 연구에 필요한 RNA 합성 기술 상의 난점으로 인하여 wild-type 염기서열을 변형한 RNA(Fig. 3-2A)의 구조를 우선 규명한 후, 다시 wild-type 염기서열의 RNA 구조를 규명하였다.(Fig. 3-1A)

2. 실험 방법

가. RNA 시료 준비

(1) 변형 RNA 시료 준비 : 화학적으로 합성한 DNA template와 T7 RNA polymerase를 사용하여 Fig. 3-2A의 5'-GGAGCAGAAACAAGGCUUCGGCCUGCUUUUGCUC-3' 염기서열을 가지는 RNA를 합성하였다. (Milligan, 1987) 합성된 RNA는 denaturing 상태의 15% polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA는 10mM sodium phosphate(pH 6.5)+0.01mM EDTA 용액 상태로 만들어 NMR tube로 옮겨졌다. RNA 농도는 약 2mM였다.

(2) 변형 RNA의 in vitro 전사 확인 : influenza virus의 polymerase는 기 발효된 논문의 방법을 이용하였다. (Seong & Brownlee, 1992a) dir 0.1 μ g의 micrococcal nuclease-treated influenza core protein을 60ng의 변형 RNA와 섞은 후 15분 동안 30 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그 후 50mM Tris-HCl(pH 7.8), 50mM KCl, 10mM NaCl, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 1mM ATP, 0.5mM GTP, 0.25mM UTP, 10 μ M CTP, 50 μ M [α -³²P]CTP, 4U RNasin(Promega), primer인 1mM ApG 등으로 구성된 전사 buffer를 더하여 반응 용액의 부피가 10 μ l가 되게 하였다. 반응 혼합액은 2시간 동안 30 $^{\circ}$ C에서 배양시킨 후 phenol extraction, ethanol precipitation 과정을 거쳐 15% 8M urea polyacrylamide gel로 분석하였다.

(3) wild-type RNA 시료 준비 : wild-type RNA 염기서열은 A로 시작하므로 T7 RNA polymerase를 사용하는 in vitro 전사 방법으로는 합성되지 않는다. 이 문제를 극복하기 위하여 G로 시작하는 41-nt의 substrate RNA를 먼저 (1)의 방법으로 합성한 후, Fig. 3-1C와 같이 trans-cleaving hammerhead ribozyme RNA를 사용하여 잘라 31-nt wild-type RNA를 준비하였다. Hammerhead ribozyme도 (1)의 방법으로 합성하였다. Substrate RNA는 보통의 NTP를 사용하여 unlabeled RNA와 동위원소로 라벨링된 RNA 합성을 위하여 13C와 15N으로 치환된 rNTP를 사용하여 labeled RNA를 합성하였다. (Batey, 1992) Hammerhead ribozyme을 이용한 trans-cleavage 반응은 55 $^{\circ}$ C에서 substrate와 ribozyme을 10:1의 비율로 섞어 50mM Tris(pH 7.9), 28mM MgCl₂ 용액에서 60분간 행해졌다. 잘려진 RNA는 15% polyacrylamide-7M urea gel로 정제하였다. 최종적으로 RNA는 10mM sodium phosphate(pH 6.5)+0.01mM EDTA 용액 상태로 NMR tube에 준비되었으며, 라벨링되지 않은 RNA의 농도는 2mM, 13C와 15N으로 이중라벨링된 RNA의 농도는 0.5mM였다.

나. NMR Spectroscopy

NMR spectrum은 Bruker DRX400, DMX600, DRX800을 사용하여 측정하였다. 변형 RNA 시료에 대하여는 mixing time 150ms와 400ms의 H₂O NOESY, 그리고 80ms, 150ms, 400ms의 D₂O NOESY, 또한 DQF-COSY 등의 spectrum을 획득하였다. Wild-type RNA 시료에 대하여는 100ms와 200ms mixing time의 NOESY, DQF-COSY, TOCSY, 1H-31P HETCOR, 1H-31P hetero-TOCSY, 1H-15N HSQC, 1H-13C HSQC, HCCH-COSY, HCCH-RELAY, HCCH-TOCSY, 3D HCCH-TOCSY(Kay et al., 1993) 등의 spectrum을 획득하였다.

다. 구조 계산

(1) 변형 RNA : 핵간 거리는 pyrimidine H5-H6 거리가 2.45Å인 것을 기준으로 하여 NOESY spectrum의 cross-peak 크기로부터 계산하였다. Cross-peak 크기는 strong, medium, weak, 그리고 very weak, 네가지로 구분하여 upper bound를 2.5 Å, 3.5Å, 5.0Å, 7.0Å로 각각 부여하였다. 또한 DQF-COSY로부터 coupling constant를 측정하여 구조계산에 활용하였다. Ribose sugar conformation은 H1'-H2' scalar coupling constant로 결정하였으며 glycosidic angle은 H1'-H6/H8 NOE 크기로 결정하였다. UUCG tetra loop 구조는 발표된 논문의 구조를 이용하였다.(Allain & Varani, 1995) AMBER force field를 사용하는 InsightII software를 사용하여 Silicon Graphics workstation에서 구조를 계산하였다. 최초 구조는 distance geometry를 사용하여 구하였고 simulated annealing 과정을 거쳤다 : restrained energy minimization과 1000K에서 20ps 동안 1.0fs step으로 restrained molecular dynamics를 행한 후 20ps 동안 300K로 온도를 점차 낮추었다. 최종적으로 2000 cycle의 energy minimization 과정을 수행하여 구조를 구하였다.

(2) Wild-type RNA : 80, 150, 250ms mixing time의 NOESY spectrum의 cross-peak 크기로부터 1.8-3.4Å, 2.5-4.5Å, 3.5-6.0Å, 4.0-7.0Å의 핵간 거리로 분류하였다. Backbone dihedral angle은 1H-31P HETCOR 실험으로부터 구하였다. Distance geometry로 구한 최초 구조를 3000K에서 10ps 동안 restrained molecular dynamics를 한 후 50ps 동안 300K로 낮추었다.

3. 결과 및 토의

가. 변형 RNA

(1) *in vitro* 전사기능 확인 : 변형 RNA가 template로서 기능을 할 수 있는지를 확인하기 위하여 micrococcal nuclease로 처리한 influenza core를 polymerase로 사용하여(Seong & Brownlee, 1992b) *in vitro* 전사 여부를 확인하였다. Fig. 3-2B에서 template RNA size와 크기가 같은 full-length RNA transcript가 확인되었다. 생성물은 size의 microheterogeneity를 보이는데 이것은 이전 실험에서도 panhandle의 경우나(Seong & Brownlee, 1992b) 3'-RNA template의 경우에서(Seong & Brownlee, 1992a) 유사한 양상을 보였다.

(2) NMR 분석 : Sequential NOE connectivity로부터 G2-A9 & A13-C16이 U27-C34 & G21-U24와 base pair를 이룸으로써 이중나선 구조가 됨을 알 수 있다. 이 부위는 G-U pair를 포함하기 때문에 A-type 구조에서 약간 벗어나 있다. G25 imino proton과 C11 H5 & amino proton과의 NOE로부터 G25가 C11과 Watson-Crick base pairing을 하는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 3-3A) A10의 H2와 U27의 H1'이 NOE를 보이는데 이것은 A10이 helix에 stack되어 있음을 의미한다. A12 H2와 G25 H1' 간의 NOE 또한 A12가 stack되어 있는 것을 보여준다. Fig. 303B는 DQF-COSY spectrum의 H1'-H2' region이다. U18과 C19의 H1'-H2' cross-peak 존재는 두 nucleotide가 C2'-endo sugar conformation을 취함을 보여준다. Internal loop 주위의 A12와 A13, G25, 그리고 helix 말단의 G2와 C34 또한 약하지만 cross-peak를 보여주는데 이것은 sugar conformation이 C2'-endo와 C3'-endo의 conformational equilibrium에 있는 dynamic한 양상을 보여주는 것이다. RNA 끝부분에 UUCG tetraloop을 도입하였는데(Cheong et al., 1990) 이것은 RNA 구조의 stability를 부여하였고 기 assign된 chemical shift 정보(Varani et al., 1991)를 assign의 출발점으로 활용하였다.

(3) RNA 구조 : Distance geometry와 molecular dynamics로부터 16개의 최종 구조를 구하였다. 최종 구조의 통계자료와 energy는 Table 3-1에 보고하였다. Fig. 3-4에 보여준 superimposed 구조의 G1을 제외한 rmsd는 $1.18 \pm 0.29 \text{ \AA}$ 였다. G7과 U29의 G-U base pair는 A-form에서 많이 벗어난 구조는 아니었으나 다른 base pair에 비해 부분적으로 열린 구조였다.

최종 구조의 backbone torsion angle과 sugar pucker를 Fig. 3-5에 plot하였다. Bulged nucleotide인 A10과 A12는 5'-side에서 stacking되어 있다. C11-A12 step은 helical twist가 8° 로서 underwound되어 있으며 A10-C11 step은 45° 로 overwound되어 있다. 두 bulged nucleotide에 의해 A10, A12, A13, G14의 구조는

전형적인 A-form 구조로부터 벗어나 있다. A10과 A12의 backbone 구조는 $\alpha^+\gamma^+$ 와 $\alpha^-\gamma^-$ 의 conformational equilibrium 상태에 있다. 전형적인 A-form 구조가 α^- 와 γ^- 인 반면, A13은 $\alpha^+\gamma^+$ 이고 G14는 $\alpha^-\gamma^-$ 이다. Modeling에 의하면 A10과 A12가 stack되어 있는 반면 C26은 helix에 stack되어 있지 않고 주위 base와 수직방향으로 minor groove에 위치하고 있다. 이 구조는 C26의 amino proton과 A12의 N1에 의한 수소결합과 C26의 O2와 G25의 amino proton에 의한 수소결합에 의해 안정화되어 있다. 그러나 이러한 수소결합에 대한 직접적인 NMR 증거는 확인할 수 없었다. RNA에 있어 이러한 수직적인 orientation은 HIV-2의 TAR-argininamide complex 구조(Brodsky & Williamson, 1997)에서도 발견된 바 있다. 이전의 연구에 의하면 C11과 G25는 base pairing을 하지 않는 것으로 보고되었으나 본 연구에 의하면 Watson-Crick base pair를 하는 것으로 밝혀졌다. Internal loop 내에서의 base pairing은 RNA 구조에서 흔히 관찰되는 것으로서 IRE RNA의 NMR 연구에 유사한 구조가 보고되었다.(Gdaniec, 1998)

Fig. 3-6은 minor groove에서 panhandle RNA의 중앙 부위를 바라본 것이다. A12, A13, G25의 H1'-H2' coupling constant는 4-6Hz로서 sugar conformation이 dynamic함을 암시하는데, 최종 modeling 구조에서는 A12가 C3'-endo를, A13과 G25가 C2'-endo 구조를 취하는 것으로 계산되었다. 이러한 sugar conformation은 G25와 C11이 Watson-Crick base pair를 할 수 있도록 만들어 준다. 이것은 modeling 연구에서 확인할 수 있었는데, G25를 C3'-endo의 sugar conformation으로 바꾸었을 때 C11과 base pair를 할 수 없었다.

(4) 구조와 기능의 상관관계 : Panhandle 구조는 전사와 복제의 regulation, 그리고 vRNA의 packaging에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 구조의 기능을 정확히 파악하려는 목적으로 이 부위의 sequence를 여러 형태로 변형하여 많은 유전학적인 연구가 행해졌다. 지금까지의 연구에 의하면, 13-16과 21-24 부위의 nucleotide가 매우 중요한 것으로 알려졌다.(Fig. 3-2A)(Fodor, 1994; Fodor, 1995; Kim, 1997) 3-12와 25-23 부근은 base pair의 형성 유무보다는 sequence 자체가 더 중요하다는 것이 알려져 있다.(Fodor, 1994; Fodor, 1995) 그러나 체계적인 연구는 아직 이루어지지 못하고 있다.

C11과 G25는 polymerase binding과 전사 기능에 매우 중요하다.(Fodor, 1993; Fodor, 1994, Fodor, 1995) C11과 G25 사이에 형성된 base pair가 polymerase와의 상호작용에 중요한 기능을 담당할 가능성도 있다. Diethyl pyrocarbonate나 base 치환에 의한 A10의 변형은 polymerase binding과 전사 기능을 약화시켰다.(Fodor, 1995; Baudin, 1994) 본 연구에서 구한 입체구조에 의하면 A10은 A-form 구조에 벗어나 있다. 계산된 구조에 의하면 A12와 C26 사이에 수소결합이 존재한다. 이것은 RNA-fork model이나(Fodor, 1994; Fodor, 1995) corkscrew model(Flick, 1996)의 타당성을 판별하는 중요한 기준이 될 것이다.

나. Wild-type RNA

(1) Trans Cleavage 반응을 이용한 시료 준비 : 31-mer RNA 시료의 준비를 위하여 T7 RNA polymerase를 이용한 *in vitro* transcription을 실시하였으나 양이 매우 적게 나왔다. 이는 이 반응에서 5'-말단에 최소한 하나 또는 두 개의 G가 존재해야 되고(Milligan, 1987), transcript의 +1과 +6 사이에 U가 없어야 하기 때문이다. 이 문제를 해결하기 위하여 wild-type sequence에 전사 조건에 적합한 sequence를 붙여 *in vitro* transcription을 하여 일단 yield가 높은 RNA를 만든 후 이것을 substrate로 하는 trans-cleaving hammerhead ribozyme으로 잘라 wild-type sequence의 RNA를 만들었다.(Fig. 3-1) 이 trans-cleavage 반응은 광범위한 반응 조건에서 매우 specific하며 효율적인 것으로 나타났다.(Fig. 3-1D) 디자인된 trans-cleaving ribozyme은 높은 turn-over rate를 가지고 있어 substrate와 ribozyme의 molar ratio가 55°C에서 50:1에 달했다. Trans- 혹은 cis-cleaving ribozyme은 T7 RNA polymerase transcript의 3' heterogeneity를 제거하는데 주로 이용되어져 왔다. 그러나 최근에는 이뿐만 아니라 T7 RNA polymerase에 대한 5' heterogeneity도 보고된 바 있다.(Helm, 1999) 따라서 본 연구는 구조연구에 있어서 homogeneous한 5' 말단 염기서열을 가진 RNA 시료를 과량으로 준비하는데 매우 유용할 것이다.

(2) 전체적인 conformation : H₂O NOESY와 ¹H-¹⁵N HSQC spectra를 통해 terminal stem과 proximal stem에서 예상대로 각각 6개와 3개의 base pair가 존재함을 확인하였다. D₂O NOESY에서 NOE connectivity는 양쪽 stem 모두가 예상대로 A-form의 geometry를 가지고 있음을 보여주었다. Internal loop는 G23에서 하나의 imino resonance만을 나타내었고 이는 C9과의 Watson-Crick 결합에 대한 전형적인 NOE pattern을 보여준다. 부가적인 imino resonance는 심지어 pH 5.5와 같은 낮은 pH 또는 Mg²⁺를 5mM까지 첨가하여도 나타나지 않았다.(data not shown) NMR data로부터 유도된 총 852개의 restraint는 11개의 converged structure를 구하기 위한 구조계산에 이용되어졌다.(Table 3-2) Average structure는 bulge가 없는 A-form helical conformation을 나타내었고(Fig. 3-7) UUCG로 된 tetraloop는 앞서 밝혀진 tetraloop의 구조와 유사하였다.(Allain, 1995)

(3) Internal loop 구조 : Internal loop의 구조는 어떤 특이한 backbone distortion은 보이지 않았다. Internal loop을 이루는 helix pattern의 extension은 주로 helix 내의 C24의 stacking으로부터 유래한 것이다. C24가 순차적인 H6_i에서 H1'_{i-1}, H6_i에서 H2'_{i-1} 그리고 H6_i에서 H3'_{i-1} nuclear Overhauser effects (NOEs)뿐만 아니라 H6_i H5'_{i-1} NOE를 가지고 있다는 것은 G23, C24 그리고 U25가 연속적으로 stacking하고 있음을 나타낸다. C24의 amino proton중의 하나와 A8의 N1

과 N6가 hydrogen bond geometry를 보여주고 있고 이러한 잠재적인 hydrogen bond의 존재는 2개의 C24 proton에 대한 상이한 chemical shift가 존재한다는 사실에 의해 부분적으로 뒷받침된다. A8+:c24 base pair에서 adenine의 N1이 protonation되어 있고 그것의 전형적인 chemical shift가 14.5 ppm인데(Puglisi, 1990) 이러한 결합은 관찰되지 않았다. A8:C24 mismatch의 stacking은 C9:G23 base pair 형성에 기여하고 결과적으로 internal loop를 안정화시킨다. C9과 C24의 stacked structure는 C9과 C24의 N3가 dimethylsulfaet modification으로부터 보호되어진다는 결과와 잘 일치한다.(Baudin, 1994) 일반적으로 C9은 30°C(Fig. 3-8A)와 -1°C에서 얻어진 DQF-COSY에서 H5-H6 cross peak을 나타내지 않았다. C9의 H5와 H6의 resonance에 대한 field-dependent broadness(Fig. 3-8B)와 함께 이러한 특징은 C9이 G23과 Watson-Crick 결합을 유지하면서 10⁻⁶초의 단위에서 유동적인 운동을 하고 있음을 의미한다.

다른 adenosine과 같이 A10과 A11은 전형적인 A-form RNA helix에서 나타나는 약한 H2_i-H1'_{i-1} NOEs를 나타내었다. 또한 A10 H2와 G23 H1사이의 cross-strand NOE가 관찰되었는데 이는 A10 base가 C9:G23 base pair의 가장 위쪽에서 helix로 stack된다는 것을 가리킨다. 그러나 A11 H2가 또한 G23 H1에 대한 cross-strand NOE를 보여준다는 것은(Fig. 3-8C) A11이 minor groove 쪽으로 치환되었음을 나타내는 것이다. 이것은 특이한 long-range NOE인데 만약 정상적인 A-form helix 내에서라면 거리가 약 8Å이 되기 때문이다. 그럼에도 불구하고 intra-NOEs와 inter-NOEs (H6/H8-H1', H6/H8-H12'과 H6/H8-H3')의 pattern은 internal loop의 5' strand에 걸쳐 연속적이다. Stacking interaction은 A11의 이동에도 불구하고 깨지지 않았다. 부가적으로 A10은 G23과 interstrand stacking에 관계하고 이는 G23의 purine ring 위에 A10 H2이 놓여지게 된다. 이러한 geometry는 ring current로 인해 A10 H2 (7.05 ppm)의 upfield chemical shift를 일으킨다. ³J_{H1'-H2'} coupling constant는 sugar pucker의 표시이며 A10 (5.1Hz), A11 (6.2 Hz)과 G23 (6.7 Hz)에서 관찰되어진 5-6 Hz의 ³J_{H1'-H2'} C3'-endo (³J_{H1'-H2'}<2 Hz)와 C2'-endo (³J_{H1'-H2'}>8~9 Hz) sugar conformation 사이에서 dynamic equilibrium이 존재함을 암시한다.

Minor groove로의 A11 치환은 internal loop에서 뚜렷한 두 가지의 helix 특징을 유도하게 된다: Major groove는 점점 넓어지고 깊어지며 helical axis는 inter loop과 proximal stem의 경계에서 재정렬 하게 된다 (Fig. 3-7C). 이러한 구조적인 특징은 A10과 A11의 N7에 diethylpyrophosphate이 쉽게 접근할 수 있다는 chemical modification 결과(Baudin, 1994)와도 일치한다.

(4) (A-A)·U Base triple 구조 : 연속적인 adenosine (A10-A11)과 반대 strand에 있는 uracil (U22)이 (A-A)·U motif를 이룰 수 있는데 이 motif가 *E. coli* 16S rRNA에서 ribosomal protein S8의 binding site(Kalurachchi, 1998), branch-point helix에 대한 spliceosome의 binding site, phage GA coat protein의

RNA binding site(Smith, 1998)라고 보고되어져 있다. U22 immino가 낮은 pH (pH 5.5)에서도 빠른 용매 교환 때문으로 관찰되지 않았기 때문에 inter loop의 높은 dynamic nature는 U22가 몇 가지 환경속에 존재함을 나타낸다: 예를 들어 두 가지 가능한 A-U base pair 사이에서 평형상태에 있거나 base triplet interaction을 하는 경우이다. 후자는 본 구조에서 관찰되었고 또한 낮은 pH 조건에서 Smith & Nikonowicz (1998)에 의해 얻어진 (A-A)·U motif 구조에서도 관찰되었다. 이들은 비정상적으로 높은 pH (pH <6.1)에서 3' adenosine의 N1의 protonation을 관찰하였다. 그러나 본 연구에서는 그러한 protonation과 base triplet interaction이 3' adenosine (A11)에 의해 중재되는 새로운 (A-A)·U motif(Fig. 3-7C)를 관찰하지 못했다.

A11과 U22에 대한 mutation은 promoter efficiency를 wild type에 비해 2-20% 정도로 심각하게 감소시키며 10 혹은 11과 22 위치 사이에서 base pair를 회복시키는 complementary mutation도 promoter efficiency를 회복시키지 못하였다. 이러한 결과와 우리의 구조 data는 A10, A11과 U22가 Watson-Crick base pair를 이루지 못하고 viral polymerase와의 interaction을 위해 major groove에서 adenosine의 amino group과 같은 특이적인 functional group을 제공함을 보여준다.

(5) Terminal Stem 구조 : Terminal Stem은 average structure에 대해 0.7Å의 root mean square deviation으로 수렴한다.(Fig. 3-9A) Helical parameter analysis는 terminal stem의 global helical axis가 A4:U28에서 major groove로 $45 \pm 6^\circ$ 로 구부러져 있음을 나타낸다.(Fig. 3-9B) Kink의 존재에도 불구하고 U27위에 U28이 stacking되고 G29위에 A4가 stacking한다는 것은 A4:U28 base pair에 대한 큰 propeller twist angle($-29 \pm 4^\circ$)를 의미한다: 이러한 propeller twist angle은 정상적인 A-form helix(-14°)의 각도보다 2배 이상 큰 것이다. 비대칭적 helix는 U28-U3와 U28-G29의 imino to imino NOEs가 없다는 것으로부터 분명해지고 이것은 H₂O NOESY에서 U28-G5와 U28-U27의 imino to imino NOEs가 존재한다는 것과 상반되는 사실이다. Kink는 4.8 Hz와 4.9 Hz의 $^3J_{H1'-H2}$ 에서 밝혀졌듯이 U28과 A6의 local dynamics에 의해 수용되어질 것으로 추정된다.

Kink는 인접한 base pair의 비정상적인 twist angle에 의해 수용되어진다. A6-U26 base pair에 대한 U3-G29 base pair로부터, 앞선 base pair에 대한 twist angle은 $44 \pm 2^\circ$, $25 \pm 3^\circ$, $27 \pm 2^\circ$ 과 $43 \pm 2^\circ$ 로서 각각은 terminal stem의 평균 값으로부터 많이 벗어나 있다 (Cho, 1993). G:U wobble pair에 대한 인접 base pair에 대한 under- 또는 over-twist angle pattern은 G:U wobble pair를 포함하는 crystal structure에서도 발견되었다.(Masquida & Westhof, 2000)

Influenza A virus promoter에 대한 앞선 구조분석에서(Cheong, 1999) bending은 관찰되지 않았다. 이는 주로 U3가 cytosine으로 치환되었기 때문이다. 본 연구와 앞선 구조에서의 두 가지 차이점은 이러한 치환과 그로 인해 나타난 결과

(C24 bulge와 A11:U22)일 것으로 추정된다. 이러한 구조의 차이는 주로 독립적으로 얻어진 spectral data에 기초하며 helical phase difference와 같은 long range effect(Wimberly, 1993)를 고려하면 합리적으로 해석될 수 있다.

4. 참고 문헌

- Palese, P. and Kingsbury, D.W., eds (1983) *Genetics of Influenza Virus*, Springer, Vienna.
- Seong, B.L. (1993) *Infectious Agents and Disease* 2 17-24
- Krug R.M., Alonso-Caplan F.V., Julkunen I., and Katz M.G. (1989) *The Influenza Viruses*, Plenum Press, New York, p. 89-152
- Flick, R., Newmann, G, Hoffmann, E., Newmeier, E., and Hobom, G. (1996) *RNA* 2, 1046-1057
- Desselberger, U., Racaniello, V.R., Zazra, J.J., and Palese, P. (1980) *Gene* 8, 315-328
- Robertson, J.S. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 3745-3757
- Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8140-8144
- Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin J.D., and Palese P. (1989) *Cell* 59, 1107-1113.
- Fodor, E., Seong, B.L., and Brownlee, G.G. (1993) *J. Gen. Virol.* 74, 1327-1333
- Fodor, E., Pritlove, D.C., and Brownlee, G.G. (1994) *J. Virol.* 68, 4092-4096
- Luo, G., Luytjes, W., Enami, M., and Palese, P. (1991) *J. Virol.* 65, 2861-2867
- Li, X. and Palese, P. (1994) *J. Virol.* 68, 1245-1249
- Tiley, L.S., Hagen, M., Matthews, J.T., and Krystal, M. (1994) *J. Virol.* 68, 5108-5116
- Cheong, H.K., Cheong, C., and Choi, B.S. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 4197-4201
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15, 8783-8798
- Seong, B.L. and Brownlee, G.G. (1992) *J. Gen. Virol.* 111, 3115-3124
- Hore, P.J. (1983) *J. Magn. Reson.* 55, 283-300
- Marion, D. and Wuthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 967-974
- Sklenar, V. and Bax, A. (1987) *J. Magn. Reson.* 75, 378-383
- Muller, N., Ernst, R.R., and Wuthrich, K. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 6482-6492
- Allain, F.H. and Varani G. (1995) *J. Mol. Biol.* 250, 333-353
- Varani, G., Cheong, C., and Tinoco, I., Jr. (1991) *Biochemistry* 30, 3280-3289

- Brodsky, A. S. and Williamson, J. R. (1997) *J. Mol. Biol.* 267, 624-639
- Gdaniec, Z., Sierzputowska-Gracz, H. and Theil, E. C. (1998) *Biochemistry* 37, 1505-1512
- Seong, B. L. and Brownlee, G. G. (1992) *Virology* 186, 247-260
- Fodor, E., Pritlove, D.C., and Brownlee, G.G. (1995) *J. Virology* 69, 4012-4019
- Kim, H. J., Fodor, E., Brownlee, G. G. and Seong, B. L. (1997) *J. Gen. Virology* 8, 353-357
- Yamanaka, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Ishihama, A., and Nagata, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5369-5373
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (1994) *The EMBO J.* 13, 3158-3165
- Klumpp, K., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (1997) *The EMBO J.* 16, 1248-1257
- McCanley, J. W. and Maky, B. W. J. (1983) *Biochem. J.* 211, 281-294
- Lamb, R. A. and Choppin, P. W. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 461-506
- Ishihama, A. and Nagata, K. (1988) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 27-76
- Lee, K. H. and Seong, B. L. (1998) *J. Gen. Virology* 78, 1923-1934.
- Schmaljohn, C. S. (1996) *Fundamental Virology*, 3rd edn, pp 675-690. Edited by B. N. Fields et al., New York, Raven Press

Table 3-1. Statistics and energy analysis of the final structures

Number of distance restraints	
Inter residue	111
Intra residue	87
Hydrogen bonds	77
Energy type	Energy value (kcal/mol)
Total energy	-139.5 ± 4.27
Bond energy	22.1 ± 0.23
Valence angle energy	156.2 ± 1.81
Dihedral angle energy	408.5 ± 2.99
Hydrogen bond energy	-25.9 ± 0.51
Non-bond energy	-280.0 ± 3.68
Non-bond repulsion energy	1123.8 ± 5.54
Non-bond dispersion energy	-1403.8 ± 7.27
Coulomb energy	-420.7 ± 2.25

Energy values are expressed as mean values \pm standard deviations.

Table 3-2. Structure determination statistics for the 11 converged structures of the influenza A virus promoter

Table 1. Structure determination statistics for the 11 converged structures of the influenza A virus promoter	
Number of NOE distance restraints	563
Internucleotide	278
Intranucleotide	285
Internal loop (residues 8-11, 22-24)	93
Terminal stem (residues 1-7, 25-31)	252
Dihedral angle restraints (α , δ , ϵ , ζ and χ)	112
Dihedral angle restraints based on the	
A-form geometry	78
Base pair restraints including H-bonding	68
Base planarity restraints	31
Total number of restraints	852
R.m.s.d. for all heavy atoms relative to the averaged structure (\AA)	
Terminal stem (residues 1-7,25-31)	0.7 ± 0.2
Internal loop (residues 8-11,22-24)	0.6 ± 0.3
UUCG tetraloop (residues 14-19)	1.0 ± 0.9
All nucleotides	1.6 ± 0.4
Average NOE violations (\AA)	$0.6 (>0.3\text{\AA})$
Average Angle violations ($^\circ$)	$0.4 (>5^\circ)$
Mean deviation from covalent geometry	
Bond lengths (\AA)	0.002
Angles ($^\circ$)	0.7
Improper ($^\circ$)	0.4

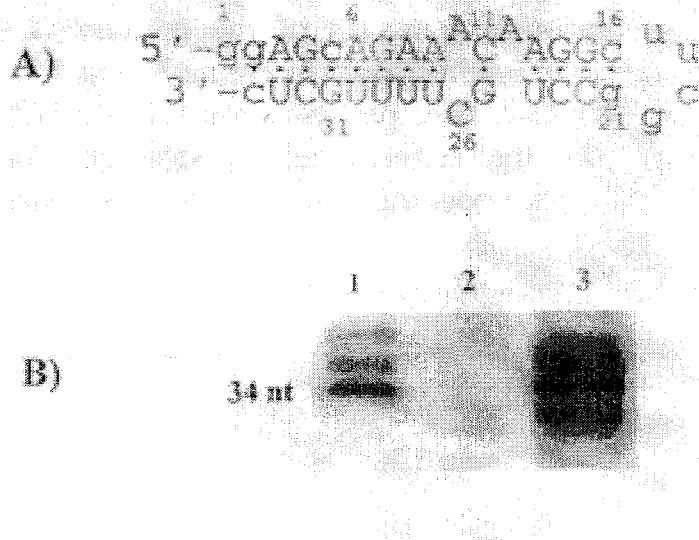


Fig. 3-2. (A) Secondary structure and numbering scheme of the influenza virus model RNA panhandle structure. Extra nucleotides introduced at the tetraloop and at both 5'-end and the 3'-end and the U to C transition mutation within the duplex are shown in small characters. (B) In vitro transcription of the model RNA template. Lane 1, 34 nt model RNA T7 transcript as a size marker; lane 2, without added model RNA; lane 3, with the added model RNA.

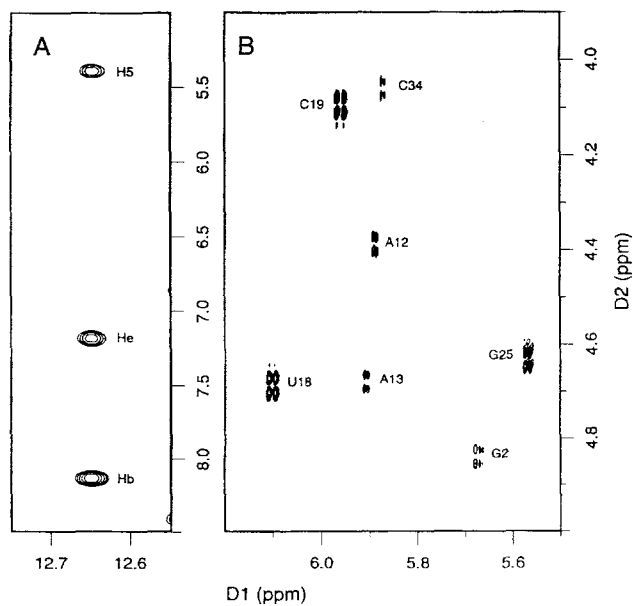


Fig. 3-3. (A) Section of a NOESY spectrum in water at 150ms mixing time at 14°C. The G25 imino to C11 H5 and amino NOE cross peaks indicate a Watson-Crick base pair between the nucleotides. (B) Section of a DQF-COSY spectrum in D2O at 30°C showing the H1'-H2' couplings.



Fig. 3-4. Superposition of the 16 converged structures of the panhandle RNA. With the exception of nucleotide G1, the average rmsd value was $1.18 \pm 0.29 \text{ \AA}$. The hydrogen atoms and the dangling G1 nucleotide are not shown for clarity.

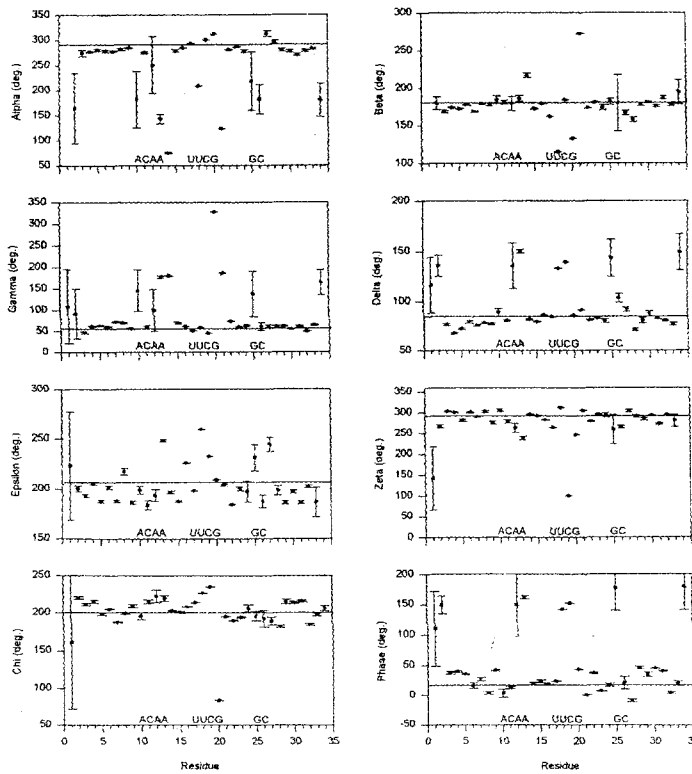


Fig. 3-5. Plots of dihedral angles and sugar pucker for the final structures of the panhandle RNA. Standard deviations from the mean are represented by error bars. Angles of the standard A-form RNA are indicated by horizontal lines.

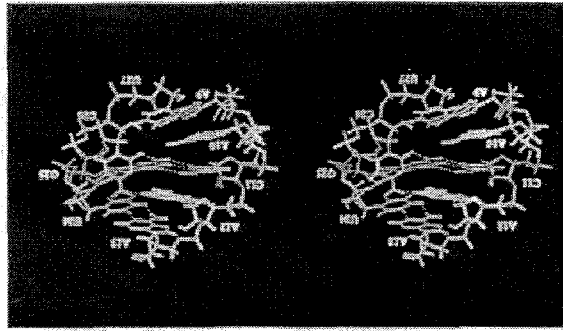


Fig. 3-6. Central region of the panhandle RNA from the perspective of the minor groove.

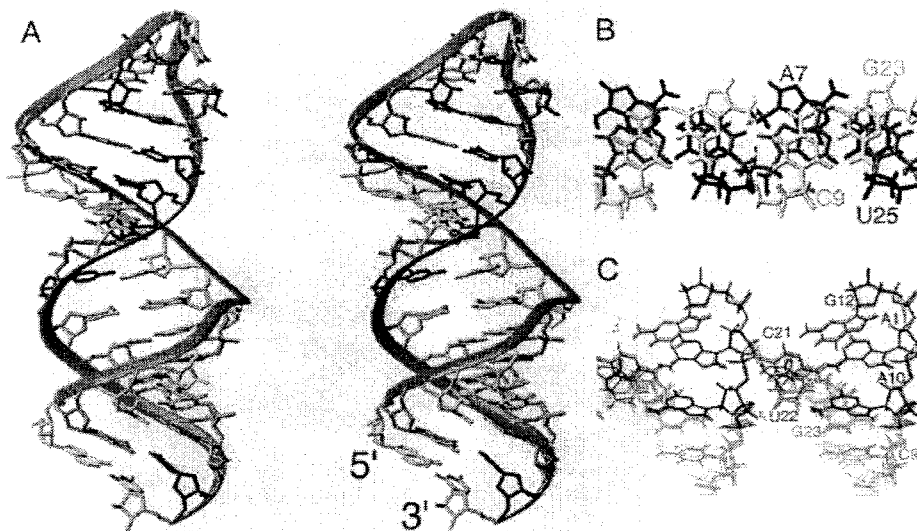


Fig. 3-7. (A) Overall structure of the influenza A virus promoter. Adenine nucleotides are shown in yellow, guanines in purple, cytosines in blue and uracils in cyan. (B) Stacking of the A8:C24 mismatch shown in red. (C) Structure of (A10-A11):U22 triplet. For clarity, only 8 structures are shown superimposed.

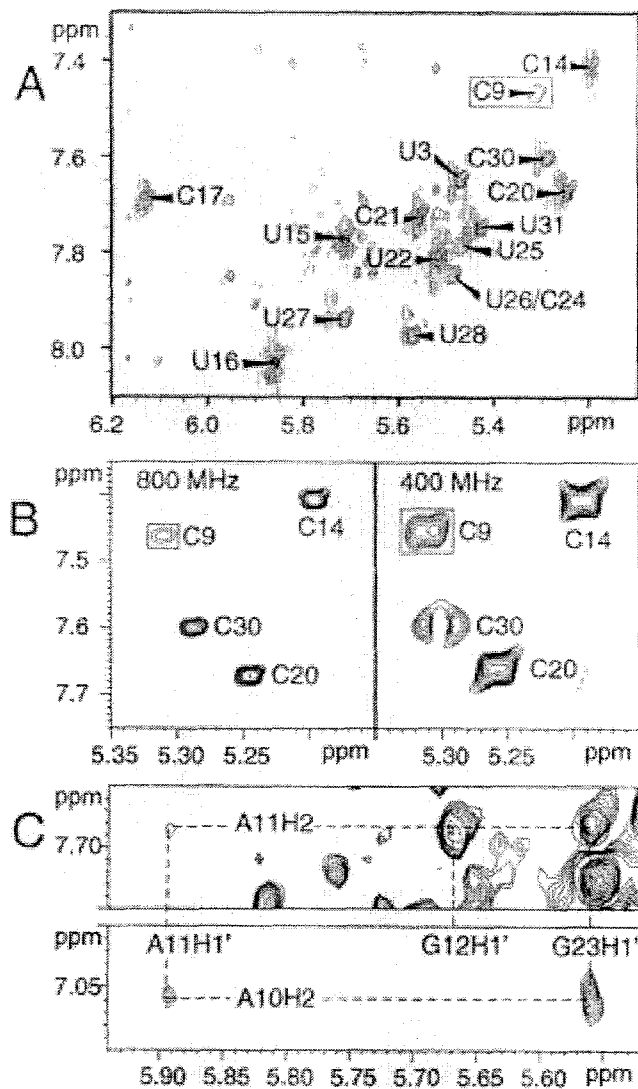


Fig. 3-8. (A) The pyrimidine H5 to H6 region of 80ms NOESY spectrum (green-blue) superimposed upon DQF-COSY spectrum (orange-red). Each H5-H6 cross peak of pyrimidines was assigned on the NOESY spectrum. (B) Selected NOE cross peaks of H5 and H6 of pyrimidine residues obtained from 400MHz and 800MHz NOESY spectra at 294K. (C) H2 to H1' region of 150ms NOESY spectrum recorded at 294K. The H2 resonances of A10 and A11 are indicated by a horizontal dashed lines and the H1' resonances of A11, G12 and G23 are indicated by a vertical dashed line. The red circled cross peak indicates the unusual NOE between A10H2 and G23H1'.

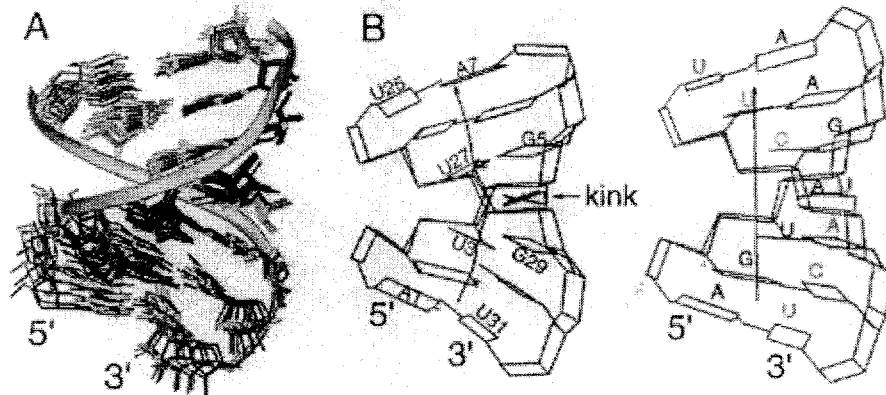


Fig. 3-9. (A) The 11 converged structures, superimposed on terminal stem. (B) Schematic representation of the helical geometry of the terminal stem (left) and of a normal A-form helix (right) with a complete Watson-Crick base pairs. The one-headed arrow indicates the helical axis. This figure was generated from Curves 5.2.

제4절 *Saccharomyces cerevisiae* virus RNA 구조

1. 서론

Hairpin loop과 bulge는 단백질 인식과 결합(Witherell, 1991; Eguchi & Tomizawa, 1991; Jaeger, 1994), RNA folding(Uhlenbeck, 1990; Woese, 1990; Tang & Draper, 1990)을 위한 중요한 구조적 모티프이다. 핵자기공명분광은 이차구조적 요소, 이를테면 hairpin loop, bulge, internal loop, pseudoknot을 포함하는 RNA 분자의 3차 구조를 결정하는데 이용되어왔다(Moore, 1993; Feigon, 1996). Watson-crick 염기쌍으로 이루어진 RNA의 stem 부위는 A-form을 가지는 것이 보통이지만, 염기 서열과 구조적 배열에 기인하는 국소적 perturbation이 존재하는 것이 일반적이다. 개개 loop의 conformation은 매우 다양하다. 일부 작은 loop에서는 매우 안정된 구조가 관찰되기도 하고(Cheong, 1990; Heus & Pardi, 1991; Laing & Hall, 1996), 비교적 큰 loop에서는 multiple conformation의 존재나 활발한 운동성으로 인해 그 구조를 결정하기가 어려운 경우가 많다(Jaeger & Tinoco, 1993; Colvin, 1993). 하지만 loop의 크기와 그 conformational flexibility를 단순히 연결짓기에는 무리가 있다. Bulge의 conformation 역시 매우 다양한 양상을 보이는데, 하나의 염기로 이루어진 bulge의 경우에 이웃한 염기쌍의 성질에 따라 그 conformation이 좌우되는 것이 그 예이다(Wimberly, 1993; Borer, 1995; Greenbaum, 1996).

효모 *Saccharomyces cerevisiae*에 존재하는 double-stranded RNA 바이러스 L1 (ScVL1)의 Cap-Pol fusion 단백질은 바이러스의 plus strand RNA 중 짧은 부분을 인식한다. 이 부위를 viral binding site (VBS)라고 하는데, 이것은 바이러스 particle이 plus strand에 결합할 때와 바이러스 RNA를 packaging할 때 중요하다(Wickner, 1996). Stem-and-loop로 이루어진 이 부위는 5개의 뉴클레오타이드로 이루어진 loop과 internal bulge-loop을 구성요소로서 포함하고 있다(Fujimura, 1990; Shen & Bruenn, 1993). ScVL1은 하나의 VBS를 가지고 있는 반면, ScVL1의 satellite 바이러스인 ScVM1은 두 개의 VBS를 가지고 있다(Fig. 4-1). 현재까지 Cap-Pol fusion 단백질과의 결합에 중요하다고 알려진 요소는 stem의 존재, loop의 염기 서열, bulge를 이루는 adenosine 잔기이다(Shen & Bruenn, 1993; Yao, 1997). 일부 strain에 존재하며, L1 바이러스에 의해 제공되는 ScV particle에 분리되어 packaging되는 ScVM1은 단지 두 가지 단백질만을 생산하는데, the killer toxin과 그 toxin에 면역성을 보이는 단백질이 그 둘이다. 이 toxin의 phenotype을 이용해 L1 바이러스 시스템의 유전학적 분석이 이루어졌다. ScVL1, ScVM1 바이러스 시스템은 상당히 연구가 많이 이루어져 있다. 본 연구에서는 ScVM1의 두 VBS RNA SL1과 SL2의 용액 상의 3차 구조를 핵자기공명분광법과 restrained molecular dynamics를 이용하여 규명하였다. 그리고 유사한 구조를 가지는 R17 coat protein binding

site(Romaniuk, 1987; Schneider, 1992; Stockley, 1995)의 variant(Fig. 4-1)의 핵자기공명구조와 비교, 분석했으며, Cap-Pol fusion 단백질과 VBS RNA 사이의 상호작용 및 인식 기전에 대한 고찰을 수행하였다.

2. 실험 방법

가. 시료준비

SL1 (20 nucleotide) 및 SL2 (28 nucleotide) VBS RNA는 전술된 RNA 시료 합성 기술에서와 같이 T7 RNA 중합효소와 화학적으로 합성된 DNA template를 이용한 *in vitro* transcription 방법으로 합성하였다(Milligan, 1987; Wyatt, 1991). 합성된 transcript를 20% 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 이용하여 정제하였다. 정제된 올리고뉴클레오타이드를 10 mM sodium phosphate, pH 6.5, 0.01 mM EDTA로 dialysis하였다. 그 후, 시료를 동결건조하였다. Nonexchangeable proton에 관련된 실험을 위해서는 시료를 99.9% D₂O로 몇 차례 교환 후, 99.96% D₂O 0.2 mL에 녹였으며, exchangeable proton 관련 실험을 위해서는 시료를 90%H₂O/10%D₂O 0.2 mL에 녹였다. 시료의 농도는 2 mM이었다. Labeled SL2 RNA 시료의 경우 전술된 방법으로 준비된 labeled NTP를 이용하였으며 최종 농도는 0.5 mM이다.

나. NMR 실험

모든 실험은 600M Bruker DMX600 핵자기공명 분광기기를 이용하였다. 따로 언급이 없는 한 20 °C 또는 에서 측정하였으며, 데이터는 Felix (Biosym/MSI)와 UXNMR (Bruker)을 이용하여 프로세스되고 디스플레이되었다. 모든 이차원 핵자기공명 스펙트럼은 TPPI 방법을 사용하여 phase-sensitive mode로 기록되었다 (Marion & Wüthrich, 1983). H₂O 상에서의 NOESY 스펙트럼은 5, 10, 20°C에서 측정되었다. Water suppression은 jump-return pulse를 이용하였다 (Hore, 1983). D₂O 상에서의 NOESY 스펙트럼은 50, 100, 150, 200, 400 ms의 mixing time에서 측정되었으며, 겹쳐진 피크들을 분리하기 위하여 10°C와 30°C에서도 실험을 수행하였다. DQF-COSY 스펙트럼은 standard pulse sequence를 이용하여 4,800Hz의 스펙트럼 폭으로 얻어졌고, high-resolution, phosphorus-decoupled, DQF-COSY 스펙트럼은 1,800Hz의 폭으로 얻어졌다. TOCSY 스펙트럼은 mixing을 위해 DIPSI2 sequence를 이용하여 측정되었다. HETCOR와 HET-TOCSY 스펙트럼은 ¹H 축은 1,800Hz, ³¹P 축은 580Hz의 폭으로 얻어졌다. 그외의 실험들은 전술된 다차원 다핵종 NMR 기술에서와 같은 방법으로 실험하였다.

다. Modeling의 Constraints

Nonexchangeable proton 사이의 semiquantitative distance constraint는 다른

mixing time (50, 100, 150 ms)에서 얻어진 2D NOESY 스펙트럼에서의 cross-peak의 강도에 의해 도출되었다. 고정된 피리미딘 H5-H6의 거리 (2.45 Å)를 기준으로 하여 피크의 강도는 강함, 중간, 약함, 매우 약함, 일부 명확한 경우에 한해서는 없음으로 분류되었다. 거기에 상응하는 거리는 1.8-3, 2-4, 3-5, 4-7, >4.5 Å이었다. Exchangeable proton을 포함하는 distance constraint는 약함, 매우 약함으로 분류되었다. 염기쌍 내의 거리인 A·U H2-NH, G·C NH-NH2는 예외적으로 강함으로 분류되었다. Sugar pucker와 backbone dihedral angle에 관한 constraint는 $^3J_{H-H}$, $^3J_{H-P}$ coupling의 semiquantitative 측정에 의해 도출되었다 (Williamson & Bax, 1988; Legault, 1995). Sugar pucker conformation은 high-resolution DQF-COSY 스펙트럼에서 $^3J_{H1'-H2'}$ 을 측정하여 결정하였다. H1'-H2' coupling이 없는 경우는 C3'-endo conformation으로, $3\text{Hz} < ^3J_{H1'-H2'} < 7\text{Hz}$ 경우는 constraint를 가하지 않았다. 그리고 7Hz 이상의 경우는 C2'-endo conformation으로 규정하였다. 모든 glycosidic torsion angle, χ 는 강한 intranucleotide H1'-H8/H6 NOE가 없다는 정보에 근거하여 anti conformation ($-150 \pm 40^\circ$)으로 제한하였다. β -와 ε -torsion angle에 대한 dihedral angle constraint는 HETCOR 스펙트럼에서 측정한 $^3J_{P-H5'}$, $^3J_{P-H5''}$, $^3J_{P-H3'}$ coupling 값으로부터 도출되었다 (Varani, 1996). γ -torsion angle에 대한 constraint는 DQF-COSY 스펙트럼에서의 $^3J_{H4'-H5'}$, $^3J_{H4'-H5''}$ coupling 값으로부터 도출되었다. α -와 ζ -torsion angle에 대해서는 dihedral angle에 대한 constraint가 가해지지 않았다.

라. 구조계산

구조 계산과 그래픽 디스플레이는 InsightII/Discover 소프트웨어 패키지를 사용하여 수행되었다. 40개의 초기 A-form 구조가 InsightII에 의해 생성되었다. 첫 단계로 이 구조들은 2000 cycle의 에너지 minimization이 수행되었다. Minimization 후, 1,000K에서 restrained molecular dynamics simulation이 수행되기 시작하였다. 이때 NOE와 dihedral angle constraint가 30ps의 period동안 1.0fs의 step size로 서서히 가해졌다. 그 후, 온도가 20ps에 걸쳐 300K로 서서히 감소되었고, 2000 cycle의 energy minimization이 수행되었다. Simulated annealing 후, 구조는 van der Waals interaction이 turn on된 상태에서 20ps 동안 300° K에서 equilibrated되었다. 2000 cycle의 energy minimization이 이어서 수행되었고, 이상의 과정을 통해 converged된 구조가 획득되었다.

3. 실험 결과

가. SL1

(1) Exchangeable proton의 assignment : Imino, amino proton의 assignment는 H₂O 상의 1D, 2D 핵자기공명실험을 이용한 standard method에 의해 이루어졌다. SL1 RNA 분자는 7개의 guanosine과 3개의 uridine 잔기를 가지고 있는데, 1D imino proton 스펙트럼에서는 그 가능한 10개 중 5개의 sharp한 peak가 관찰되었다. 그 peak들은 stem의 imino proton으로 assign되었다. 5'-end의 G1은 fraying effect 때문에 관찰되지 않았다. 이전의 제안과는 달리 A5 bulge 옆에 있는 G16은 C6와 안정된 염기쌍을 형성하지 않았다.

(2) Nonexchangeable proton의 assignment : 피리미딘의 H5와 H6 공명선은 DQF-COSY 스펙트럼에서 그들끼리의 강한 cross-peak에 의해 밝혀졌다. 관찰된 10개의 cross-peak 수가 10개의 피리미딘을 포함하는 SL1 RNA 분자의 single conformation을 확증하였다. Cytosine은 1H-13C HMQC 스펙트럼에서 C5 탄소의 chemical shift 값에 의해 uridine과 구별되어졌다. 이러한 정보는 sequential NOE 연결과 through-bond correlation에 기반한 nonexchangeable proton의 assignment를 수행하는데 출발점을 제공한다. Fig. 4-2는 400 ms NOESY 스펙트럼의 H8/H6/H2-H5/H1' 부분을 보여주고 있다. H8/H6-H1'은 A10 H1'과 U11 H6 사이를 제외한 G1에서 A10, U11에서 C20 범위에서 연결된다. 50, 100 ms NOESY와 DQF-COSY 스펙트럼의 H1'-H2' 부분이 모든 H2' 공명선을 assign하는데 사용되었다. 그 외의 sugar proton은 high-resolution, ³¹P-decoupled DQF-COSY를 이용하여 sugar의 spin system을 규명함으로써 assign되었다. Adenosine H2의 공명선은 1H-13C HMQC 스펙트럼에서 결합된 탄소의 chemical shift 값에 의해 assign되었다. 이미 이루어진 proton assignment를 이용하여 염기와 C1' 공명선에 대한 sequence-specific 탄소 assignment가 수행되었다. 3개 adenine의 C2와 aromatic 공명선 20개 (C8/C6) 모두 명확하게 assign되었다. 그리고 H1'이 겹쳐있는 G1과 C13의 C1'을 제외한 모든 C1'도 assign되었다. ¹H-³¹P HETCOR 스펙트럼은 backbone을 따라 그 sequence를 결정한다. 이 스펙트럼은 앞에서 결정된 H3'과 H5'/H5'' assignment를 이용하여 assign되었다.

(3) 구조계산 결과 : 최종적으로 얻어진 22개의 구조는 낮은 NOE violation과 total energy를 가진다. 22개 구조 중 실험적으로 도출된 NOE constraint를 0.1Å 이상 violate하는 것은 하나도 없었다. 전체 분자에 대한 average pairwise RMSD 값은 1.28Å이다. Loop과 bulge 부 분같은 국소적 구조의 특징도 핵자기공명 데이터에 의해 정확히 규명되었다. Loop (C8에서 G14)과 bulge (G4에서 G7, C15에서

C17) 부분에 대해 22개의 converged된 구조를 그 해당부분만 국소적으로 겹쳤을 때, average pairwise RMSD 값이 각각 0.57 Å, 0.46 Å이었다.

(4) 구조적 특징 : NOE의 연결, sugar pucker를 비롯한 여러 핵자기공명 실험 결과들은 RNA 분자에 대한 다량의 구조적 정보를 제공한다. 핵자기공명법에 의해 결정된 SL1 VBS RNA의 schematic한 구조와 22개 최종구조 중 11개의 구조를 겹쳐 놓은 것을 Fig. 4-3에 제시하였다. 대표적인 구조의 loop 부위를 그림 4에 나타내었다. Loop 부위에서 풍부한 distance constraint를 얻을 수 있어 loop conformation을 정확하게 규명하였다. A10 H2와 U11 H1', C13 H1' 사이의 NOE는 A10 염기가 G9 염기 위에 stack되어 있음을 나타낸다. 게다가 A10 H2와 U12 H1', U12 H5'/H5'', C13 H5, G14 H1' 사이에도 NOE가 관찰되었다. Loop에서 구조적으로 의미있는 역할을 하는 이 NOE들의 존재는 A10 H2의 T1 relaxation 성질에 의해 뒷받침된다. 이 proton은 상대적으로 짧은 T1 (4.84 ± 0.02 sec)을 갖는데, 이 값은 원래 짧은 T1 값을 가지는 H8, H6 proton의 값과 거의 같은 것이다. 이 사실은 A10 H2가 다른 AH2 proton에 비해 가깝게 이웃하는 proton이 많다는 것을 제시한다. 예외적인 interresidue sugar-to-sugar NOE가 C13 H1'과 G14 H3' 사이에서 관찰된다. Loop에 있는 몇 개의 뉴클레오타이드는 예외적인 sugar-phosphate backbone conformation을 가진다. U11과 U12의 큰 H1'-H2' coupling 값은 이들 잔기의 sugar ring이 C2'-endo conformation을 가진다는 것을 나타낸다. U11의 γ -angle은 구조 계산에서 constraint가 가해지지 않았지만 converged된 구조 모두에서 비정상적인 trans conformation을 가진다. C13의 γ -angle 역시 constraint가 가해지지 않았다. 이 작은 소수의 trans conformation이 존재하지만 gauche+ conformation으로 모여드는 경향이 있다. U11과 U12의 ϵ -angle은 gauche- conformation을 가진다. Constraint가 가해지지 않은 α -, ζ -torsion angle은 converged된 구조에서 몇몇의 구별되는 conformation으로 모여드는 경향이 있다. Loop의 아래 부분인 G9과 C13은 Watson-Crick 염기쌍을 형성하지 않는다. 그러나 22개의 최종 구조 모두에서 G9의 imino proton이 C13의 O2와 수소결합을 형성한다. 그래서 C13의 염기가 major groove 방향으로 조금 돌출하게 된다. Helical base stacking이 loop의 5'-side에서 계속되는데, A10이 G9의 위에, G9은 C8·G14 염기쌍 위에 stacking되는 형태이다. U11 잔기의 염기는 A10위에 부분적으로 stacking 되어 있다. 그러나 U12와 C13은 5', 3' 어느 쪽으로도 염기 stacking에 관여하지 않는다. U12 잔기의 염기는 major groove 방향으로 상당히 돌출되어 있다. A10과 U11 사이에서 NOE 연결이 끊어진다. 이 두 잔기는 오직 A10 H3'과 U11 H6 사이의 약한 NOE에 의해 연결될 뿐이다. A10 H1', H2'에서 U11 H6로 연결되는 NOE가 없다. 이것은 U11의 모든 비정상적인 backbone angle과 관련이 있을 수 있으며, A10-U11 단계에서 backbone의 extended conformation을 반영할 수 있다. Bulge 부위를 Fig. 4-5에 나타내었다. Bulge A5 잔기의 염기는 helical stem에 stacking되어 있음이 G4-A5-C6 NOE 연결과

A5 H2-C17 H1' cross peak의 존재에 의해 증명되었다. 그러나 G4 H1'-A5 H8과 A5 H1'-C6 H6 NOE가 약하고 G4와 C6 사이에 몇 개의 NOE가 관찰되었다. 관찰된 NOE는 G4 H1'-C6 H5, G4 H2'-C6 H5, G4 H3'-C6 H5, G4 H2'-C6 H6이다. 이것은 A5가 bulged-out conformation으로도 일정 시간 존재함을 제시한다. G16 NH와 A5, C6 NH2를 포함하는 bulge 부위의 exchangeable proton의 공명선이 관찰되지 않는다. 이것은 아마도 운동성이나 용매와의 exchange에 의한 line-broadening에 기인하는 것 같다. 이전의 nuclease sensitivity 실험은 적어도 일정 시간 이상 C6와 G16이 염기쌍을 형성하는 것으로 제안하였다. 본 핵자기공명실험에서는 G16의 imino proton 공명선을 관찰할 수 없었기 때문에, 본 연구결과로는 C6와 G16 사이의 수소 결합 형성 여부에 관해서는 결론을 할 수 없다. G4, A5, C6의 H1'-H2' coupling constant는 C3'-endo와 C2'-endo sugar conformation을 나타내는 특징적인 수치의 중간 값을 가진다. 이 잔기들의 sugar pucker는 C2'-endo, C3'-endo, O4'-endo sugar conformation을 모두 포함할 수 있도록 일정 제한을 가하지 않았다. G4, A5, C6 sugar의 운동성은 bulge 부위의 비정상적인 proton들 간의 거리를 수용하기 위해서거나 A5 염기의 stacked conformation과 bulged-out conformation 사이의 averaging을 반영하는 것으로 사료된다. Bulge의 반대편 strand에 있는 C15-G16-C17 ribose ring은 standard A-family duplex에서 관찰되는 C3'-endo conformation을 가진다.

나. SL2

(1) Exchangeable proton의 assignment : SL1 RNA와 마찬가지로 exchangeable proton에 대한 assignment가 이루어졌다. SL2 RNA는 9개의 guanosine과 5개의 uridine 잔기를 가지고 있다. SL1 RNA에서와 같이 stem의 imino proton이 관찰되었다. 하지만 2D NOESY spectrum에서 G5와 U25의 imino proton이 overlap 되었기 때문에 2차구조를 예측할 수 없었다. Labeled RNA 시료에 대한 HMQC-NOESY spectrum에서 nitrogen dimension에서 구별된 두 peak사이의 NOE connectivity를 확인함으로써 SL2 RNA의 2차구조를 완성할 수 있었다. 이전에 제안된 biochemical data와는 다른 2차 구조가 형성된 것을 확인 하였는데, U11-G21 basepair가 형성되지 않았고, 오히려 G7-C22 basepair가 형성되는 것을 알았다. 따라서 internal loop는 5' side에 4개의 nucleotides와 3' side에 1개의 nucleotide가 loop를 형성하고 5개의 nucleotide로 이루어진 loop 구조인 stem-internal loop-stem-loop의 hairpin-loop 구조를 가진다는 것을 확인 하였다.

(2) Nonexchangeable proton의 assignment : SL2 RNA에는 14개의 pyrimidine nucleotide가 있다. DQF-COSY spectrum에서 H5-H6 crosspeak는 13개만이 관찰되었다. 이 결과는 비록 SL2 RNA가 one-conformation을 가지고 있지만 전술한 바와 같이 1개의 nucleotide는 flexible 하거나 intermediate conformational exchange를 한다는 것을 알았다. DQF-COSY spectrum에서 나타나지 않은 H5-H6 crosspeak는 400ms NOESY spectrum에서 broad한 peak를 보여주었다. Fig. 4-6에 SL2 RNA의 H8/H6/H2-H5/H1' region의 spectrum을 나타내었다. Base-sugar walk는 SL1과 마찬가지로 loop와 internal loop의 일부분을 제외하고는 모두 연결되었다. SL1 RNA에서는 A10 H1' 과 U11 H6 사이의 NOE가 관찰되지 않은 것과 같이 A15 H1' 과 U16 H6 사이에 NOE가 약하게 관찰되었다. 예상과 달리 A10 H8과 G12 H1' 사이에 NOE가 관찰되는데 이는 U11이 bulged out 되고 A10과 G12가 stack 되어 있는 것을 예상할 수 있다. Fig. 4-6에서 보듯이 SL2 RNA의 base-sugar walk는 SL1 RNA에 비하여 많은 신호결침이 있다는 것을 알 수 있다. 전술한 바와 같이 pyrimidine-filtered NOESY experiments를 통하여 겹친 신호를 구별해 냄으로써 assignment를 쉽게 할 수 있었다. 또한 phosphorous와 carbon을 이용한 다차원 다핵종 NMR 기술을 이용함으로써 assignment에 많은 도움을 받았다.

(3) 구조계산 결과 : SL1 RNA에서와 같은 방법으로 구조계산을 수행하였다. 최종적으로 얻은 19개의 구조는 낮은 NOE violation과 total energy를 가진다. 전체 분자에 대한 average pairwise RMSD는 1.29 Å이다.

(4) 구조적 특징 : Fig. 4-7에 SL2 RNA의 최종 구조를 제시하였다. Loop 부위

는 NOE connectivity와 chemical shift등이 SL1 RNA와 유사함을 알 수 있었고, 구조계산결과 SL1 RNA의 loop 부위와의 RMSD도 1 Å 미만으로 같은 구조를 가지고 있다는 것을 알았다. A15는 G14위에 stack 되어 있고 G14와 C18은 Watson-Crick basepair가 아닌 unusual hydrogen bonding을 하고 있다. U17과 C18은 다른 base들과 stack 되어 있지 않으며 minor groove쪽으로 shift되어 있다. SL1 RNA와 SL2 RNA에서 loop 부위에서 차이가 나는 것은 dynamics이다. SL2 RNA의 DQF-COSY spectrum에서 H1'-H2' region에는 많은 crosspeak가 관찰되는데, A-form RNA의 C3'-endo 구조에서는 이 부위에서 crosspeak가 관찰되지 않는다. U16과 U17은 SL1 RNA와 마찬가지로 C2'-endo sugar pucker를 가진다. 하지만 나머지 loop nucleotide들은 모두가 C3'-endo 인 SL1 RNA와는 다르게 C2'/C3'-endo mixture 형태로 나타난다. 이는 internal loop의 dynamics가 long range interaction에 의하여 loop의 dynamics에 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있다. 이를 뒷받침하는 증거로는 SL1 RNA의 경우 변온실험에서 upper stem과 lower stem중에 upper stem의 melting temperature가 높았으나 SL2 RNA의 경우 lower stem의 melting temperature가 더 높은 결과를 보여주었다. 이는 upper stem의 stability가 loop nucleotide들의 dynamics에 영향을 준 것으로 해석 할 수 있다.

Fig. 4-8에 SL2 RNA의 internal loop에 대한 구조를 제시하였다. Internal loop nucleotide들은 모두 DQF-COSY에서 H1'-H2' crosspeak들을 보여주고 특히 U11은 high C2'-endo 성격을 보여주고 있다. Base-sugar walk NOE들은 internal loop의 nucleotide들도 stack되어 있다는 것을 보여준다. 하지만 A10과 U11, U11과 G12 사이에서는 이러한 base-sugar walk가 끊어지는 현상을 관찰할 수 있고, 이와 반대로 A10과 G12사이에는 정상적인 base-sugar walk와 같은 NOE가 보여지고 있다. 이는 U11이 bulge out되고 A10과 G12가 stack되어 있는 것을 이야기하며 구조계산결과에서도 마찬가지로 모양을 보여주고 있다. Internal loop는 dynamic nature를 가지고 있다. 하지만 이러한 dynamic한 구조를 안정시키는 base-phosphate hydrogen bond가 구조계산결과 발견되었다. A8의 amino proton은 G21의 phosphate와 hydrogen bonding을 형성함으로써 internal loop를 stabilize 시키고 있다.

4. 토의

L1과 M1 double-stranded RNA 바이러스의 assembly에 있어서 중요한 과정은 Cap-Pol fusion 단백질에 의한 바이러스의 plus single-stranded RNA의 인식이다 (Wickner, 1996). 이 단백질의 Pol 부위가 다섯 개의 뉴클레오타이드로 이루어진 loop과 하나의 adenine 염기로 된 bulge를 가지고 있는 RNA에 결합한다 (Fujimura, 1992; Ribas, 1994). M1 바이러스의 경우는 결합하는 RNA 중 single A bulge 자리에 세 개의 염기로 이루어진 bulge가 존재하는 RNA가 하나 더 있다 (Shen & Bruenn, 1993). 본 연구에서 제안된 SL1과 SL2 VBS RNA의 high-resolution 구조는 pentaloop과 internal loop conformation에 관한 통찰과 genomic RNA의 packaging에 필요한 Cap-Pol protein-RNA 복합체 형성에 있어서 RNA 구조의 중요성에 대한 고찰을 제공한다.

VBS RNA의 nuclease sensitivity mapping 실험은 염기서열 GAUUC를 가지는 pentaloop이 형성됨을 보여주었다. Loop의 아래에 있는 G9(or G14)과 C13(or C18) 잔기는 Watson-Crick 염기쌍을 형성할 가능성이 존재하지만, 핵자기공명법에 의해 밝혀진 본 연구결과 그렇지 않은 것으로 규명되었다. C의 위치는 근처의 proton들과의 NOE에 의해 잘 규정되었다. 그러나 규명된 3차 구조는 G와 C 사이에 예외적인 상호작용이 있음을 보여준다. 최종구조 모두에서 G의 imino proton이 C의 O2와 수소결합을 형성한다(Fig. 4-9). 이들 원자들 간의 평균 거리는 $2.13 \pm 0.08 \text{ \AA}$ 이다. G와 C 잔기를 정확하게 위치 지을 수 있는 잔기 사이와 잔기 내의 거리 constraint가 충분하게 존재한다. 특히 C 잔기는 8개의 잔기 내, 19개의 잔기 사이 거리 constraint를 가지는데, 이것은 잔기당 constraint의 평균 수치보다 꽤 높은 것이다. G와 C 두 잔기만을 겹쳤을 때, average pairwise RMSD 값이 단지 0.33 \AA 밖에 되지 않는다. 이 부위의 loop 구조가 비교적 높은 정확성을 가진다는 사실이 G를 포함하는 cross-strand 수소결합의 존재에 대한 확실성을 높여 주지만, 이 수소결합 형성을 증명하는 직접적인 핵자기공명 데이터는 없다. G imino proton의 sharp한 공명선이 없다는 것은 이 proton이 용매로부터 차단되어 있는 정도가 강하지 않다는 것을 시사한다. 하지만, 이 사실이 G imino proton이 수소결합을 형성한다는 가능성을 배제할 수는 없다.

5'-UUUCUGA-3', 5'-GCUUUGC-3', 5'-GGUCUCC-3'와 같은 관련된 loop 염기서열을 가진 hairpin motif들은 각각 U·G, C·G, G·C 염기쌍에 의해 닫혀진 triloop conformation을 가진다 (Puglish, 1990; Davis, 1993; Grune, 1996). 반면, 5'-CGUUUCG-3' 염기 서열은 본 연구의 SL1 VBS RNA의 염기서열, 5'-CGAUUCG-3'처럼 pentaloop conformation을 가진다 (Sich, 1997). UUU 염기 서열을 가지는 hairpin에 대한 이전 연구는 triloop 구조의 안정화에 있어서 context 의존성이 높고, closing 염기쌍이 중요하다는 사실을 제시한다. UUU triloop은 C·G 염기쌍에 의해서 닫히지만, G·C에 의해서는 닫히지 않는다. 본 연구의 경우 AUU 서열은 G·C

에 의해 닫히지 않는다.

In vitro selection 실험에 의하면, Cap-Pol 단백질 인식에 있어서 loop 염기 서열이 A10(or A15), U12(or U17)를 제외하고는 완전히 보존된다 (Yao, 1997). SL1 과 SL2의 loop 염기서열은 동일하고, L1은 4번째만 다르다(Fig. 4-1). 이러한 보존은 특징적인 pentaloop 구조의 필수적인 역할을 반영하는 것으로 보인다. Pentaloop인 5'-CGAUUCG-3'과 5'-CGUUUCG-3'은 꽤 다른 구조적 특징을 가진다. 본 연구에서 다루어진 5'-GAUUC-3'의 경우, 염기 stacking이 5'-side 위로 3번째 uridine까지 이어지는 반면, 4번째, 5번째 잔기는 3'-side 위로 stacking되지 않는다. 그리고 3번째, 4번째 잔기는 C2'-endo sugar pucker를 가진다. 비록 첫 번째 G와 다섯 번째 C가 Watson-Crick 염기쌍을 형성하진 않지만, 이들 두 염기는 G9 H1과 C13 O2 사이에 수소결합을 형성한다. 5번째 C는 major groove 방향으로 다소 돌출되어 있다. 5'-GUUUC-3' loop의 경우, 두 종류의 stacking 상호작용을 가지는 두 가지 conformation이 서로 전환하고 있는 것으로 제안되었다. 2번째 U와 5번째 C는 상당히 용매에 노출되어 있다. 3, 4, 5번째 잔기들은 C2'-endo sugar pucker를 가진다. 1번째 G와 5번째 C는 Watson-Crick 염기쌍을 형성하지 않고, 각각 minor와 major groove 방향을 향한다.

SL1의 Bulged adenine 염기는 *in vitro* selection에 의해 결정된 consensus ScV VBS에서 완전히 보존된다. 그리고 mutagenesis 실험에서도 A5 잔기는 절대적으로 요구된다 (Yao, 1997). 이런 결과는 A5 잔기 자체의 conformation과 hairpin loop과 bulged된 염기간의 상대적 위치 둘 다가 단백질과의 결합에 중요하다는 것을 제시한다 (Fujimura, 1990). 이전에 연구된 RNA 구조 내의 single bulge에 대한 보고는 그 conformation이 이웃한 염기쌍의 성질에 좌우됨을 보여준다 (Borer, 1995). Watson-Crick 염기쌍이 형성된 잔기들이 이웃해 있는 adenine single bulge는 intrahelical stack된 conformation이다 (Greenbaum, 1996). 반면, 한 측면에 non-Watson-Crick 염기쌍이 이웃해 있는 것은 extrahelical conformation이다. 리보솜 단백질 S8의 RNA-binding site, spliceosome branch-point helix의 RNA motif, phage GA coat protein의 RNA-binding site에서 발견되는 A-bulge motif (A-A)·U는 다른 구조를 가진다. 첫 번째 것은 G·C와 U·G 염기쌍이 이웃해 있는데, 5'-adenine 염기는 extrahelical 상태이고, 3'-adenine은 A·U 염기쌍 형성에 참여하고 있다 (Kalurachchi, 1997). 두 번째와 세 번째는 G·C와 U·A 염기쌍이 이웃하고 있는데, 두 adenine 모두 intrahelical이며, 5'-adenine이 A·U 염기쌍을 형성하는 경향이 훨씬 강하다 (Smith & Nikonwicz, 1998). SL1 VBS RNA의 bulge 부분은 Watson-Crick 염기쌍을 형성하고 있는 G와 C 잔기에 이웃한 A5의 형태이다. 그리고 이것은 이전에 연구된 phage R17 coat protein의 RNA-binding site의 variant와 동일한 염기 서열이다. 이전의 결과를 바탕으로 유추한다면 SL1 VBS의 bulge 부분은 intrahelical stacked conformation을 가질 것으로 생각된다. 본 연구 결과는 이러한 예측을 구조적 차원에서 확증한다. Bulged된 A5 잔기는 stacking

pattern을 제시하는 NOE cross peak들에 의해 helical stem 안으로 stack되어 있음이 규명되었다. 하지만 variant R17 RNA fragment의 경우처럼 SL1 VBS RNA도 G4와 C6 잔기 사이에 NOE가 존재하며, 이것은 일정시간 bulged-out conformation 또한 존재할 수 있음을 시사한다 (Borer, 1995).

Cap-Pol protein과의 상호작용이 SL1 VBS RNA의 conformation을 변경시킬 수 있기 때문에, SL1 자체의 3차 구조만으로는 단백질과 RNA의 상호작용 기전에 대한 확실한 증거를 제시할 수 없다. SL2 RNA의 internal loop conformation이 SL1의 bulge와 많이 다르다는 것은 cap-pol protein과의 상호작용에서 SL1 RNA의 conformational change가 일어날 가능성이 크다는 것을 이야기 할 수 있다. 또한 RNA 분자 내의 잔기들이 어떻게 Cap-Pol protein과 상호작용하는가에 대한 다소의 통찰은 충분히 가능하다. 구조가 잘 규명된 loop 부분에 대해서도 위의 사실은 적용된다. Loop에 존재하는 모든 피리미딘 염기들은 major groove 방향으로 향한다. 아마도 Cap-Pol protein이 SL1 RNA loop 부분의 major groove를 인식한다고 추정된다. Bulged된 A5 잔기가 대부분의 시간은 helix내에 stacked되어 있지만, 일정시간 bulged-out conformation으로도 존재한다는 사실은 강조할 만하다. Cap-Pol protein-RNA 상호작용에 있어서 bulge 부분의 해석은 상당히 신중을 기해야한다. 2차 구조에서 SL1 VBS RNA와 매우 유사한 phage R17 coat protein-binding site의 핵자기공명에 의한 구조와 X선 결정에 의한 구조는 좋은 전례가 된다. Variant R17 coat protein-binding site의 bulge 부분의 핵자기공명 구조는 SL1 VBS RNA와 매우 비슷하다. 그러나 단백질 존재 하의 결정구조에서는 bulged-out conformation을 가진다 (Valegard, 1994). 따라서 SL1 VBS RNA의 bulged A 역시 Cap-Pol protein과의 상호작용시 stem으로부터 bulge out 되어 돌출되리라는 가능성을 배제할 수 없다. SL2 RNA의 A10은 다른 nucleotide로 mutation 되었을 때 functional 하다는 것이 밝혀졌다. SL1과 SL2를 superimpose 시켰을 때 SL2의 A10은 SL1의 A5와 잘 겹쳐지지 않는다. 따라서 stacked-in 되어있는 A10 (or A5) base가 cap-pol protein과의 interaction에서는 bulge-out될 수 있는 가능성을 시사한다. Bulge 부분이 아닌 loop와 upper-stem 부분에서는 SL1 VBS RNA와 R17 coat protein-binding site 사이에 무시 못 할 차이가 존재한다. R17 coat protein binding site의 loop sugar conformation에서의 variation과 upper-stem의 두 imino proton이 용매에 노출되어 있다는 사실은 R17의 hairpin segment가 빠른 conformational fluctuation을 보임을 시사한다. 한편, SL1 VBS RNA는 rigid한 loop conformation과 두 개의 upper-stem imino가 sharp한 공명선을 보여준다. SL1의 upper-stem의 길이가 (염기 서열이 아니라) 단백질 인식에 중요하다는 사실을 고려할 때, rigid한 upper-stem은 hairpin loop과 bulged base의 상대적 위치를 올바르게 정하는 역할을 할 수 있다. 이러한 사실은 단백질과 결합할 때 RNA가 겪는 conformational change의 정도가 SL1 VBS와 R17이 다를 수 있다는 것을 제시한다. 이는 SL1 VBS RNA는 loop 부분 자체의 conformation이 크게 변하지 않고 Cap-Pol protein과 상호작용할 수 있다는

의미이다. Coat protein에 대한 R17 coat protein binding site의 affinity는 Cap-Pol protein에 대한 VBS의 affinity보다 10-100배 약하다 (Romaniuk, 1987; Yao, 1997). 이 차이가 RNA 분자 자체의 구조적 특징과 관련이 있을 수 있다고 사료된다. 앞에서 언급된 상호작용에 대한 정확한 기전 규명을 위해서는 Cap-Pol protein (or 펩타이드)-VBS RNA 복합체의 3차 구조가 밝혀져야 할 것이다.

5. 결 론

(1) 바이러스의 plus strand와 viral particle의 결합, RNA packaging에 중요한 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 M1 double-stranded RNA 바이러스의 SL1과 SL2 VBS RNA의 3차 구조를 핵자기공명법에 의해 규명하였다.

(2) 최종적으로 high-resolution 구조를 획득하였으며, average pairwise RMSD 값은 각각 전체 분자에 대해 SL1은 1.28Å, SL2는 1.29Å이다.

(3) Penta loop을 형성하지만, loop 아래에 있는 G의 imino proton과 C의 O2가 수소결합을 형성한다. Loop 부분의 염기 stacking은 5'-side 측에서 3번째 잔기까지 계속된다. 3개의 피리미딘 염기는 모두 major groove로 향하며, 이는 Cap-pol protein과의 상호작용시 major groove 쪽이 인식되리라는 점을 시사한다.

(4) SL1의 Bulged A5 잔기는 stem 안으로 stack된 conformation을 보여준다. 하지만 bulged-out conformation이 일정 시간 존재함을 제시하는 예외적인 NOE가 존재한다.

(5) SL2의 internal loop는 dynamic한 conformation을 보여준다. 하지만 base-phosphate hydrogen bonding에 의해서 안정화되어 있다.

(6) Loop 부분과 upper-stem의 rigid conformation은 SL1 과 SL2 VBS RNA가 그 자체의 conformation 변화를 많이 거치지 않고 Cap-Pol protein과 상호작용할 수 있음을 시사한다.

6. 참고 문헌

- Borer, P. N., Y. Lin, S. Wang, M. W. Roggenbuck, J. M. Gott, O. C. Uhlenbeck, & I. Pelczer. (1995) *Biochemistry*. 34:6488-6503.
- Cheong, C., G. Varani, & I. Tinoco, Jr. (1990) *Nature*. 346:680-682.
- Colvin, R. A., S. W. White, M. A. Garcia-Blanco, & D. W. Hoffman. (1993) *Biochemistry*. 32:1105-1112.
- Davis, P. W., W. Thurmes, & I. Tinoco, Jr. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:537-545.
- Feigon, J., T. Dieckmann, & F. W. Smith. (1996) *Chem. Biol.* 3:611-617.
- Fujimura, T., J. C. Ribas, A. M. Makhov, & R. B. Wickner. (1992) *Nature*. 359:746-749.
- Fujimura, T., R. Esteban, L. M. Esteban, & R. B. Wickner. (1990) *Cell*. 62:819-828.
- Greenbaum, N. L., I. Radhakrishnan, D. J. Patel, & D. Hirsh. (1996) *Structure*. 4:725-733.
- Grüne, M., M. Görlach, V. Soskic, S. Klussmann, R. Bald, J. P. Fürste, V. A. Erdmann, & L. R. Brown. (1996) *FEBS Lett.* 385:114-118.
- Heus, H. A., & A. Pardi. (1991) *Science*. 253:191-194.
- Hore, P. J. (1983) *J. Magn. Reson.* 55:283-300.
- Jaeger, J. A., & I. Tinoco, Jr. (1993) *Biochemistry*. 32:12522-12530.
- Kalurachchi, K., K. Uma, R. A. Zimmermann, & E. P. Nikonowicz. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:2139-2144.
- Laing, L. G., & K. B. Hall. (1996) *Biochemistry*. 35:13586-13596.
- Legault, P., F. M. Jucker, & A. Pardi. (1995) *FEBS Lett.* 362:156-160.
- Marion, D., & K. Wüthrich. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:967-974.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, G. W. Witherell, & O. C. Uhlenbeck. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:8783-8798.
- Moore, P. B. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:340-344.
- Puglisi, J. D., J. R. Wyatt, & I. Tinoco, Jr. (1990) *Biochemistry*. 29:4215-4226.
- Ribas, J. C., T. Fujimura, & R. B. Wickner. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:28420-28428.
- Romaniuk, P. J., P. Lowary, H. N. Wu, G. Stormo, & O. C. Uhlenbeck. (1987) *Biochemistry*. 26:1563-1568.
- Schneider, D., C. Tuerk, & L. Gold. (1992) *J. Mol. Biol.* 228:862-869.
- Shen, Y., & J. A. Bruenn. (1993) *Virology*. 195:481-491.

- Sich, C., O. Ohlenschlager, R. Ramachandran, M. Gorkach, & L. R. Brown. (1997) *Biochemistry*. 36:13989-14002.
- Smith, J. S., & E. P. Nikonowicz. (1998) *Biochemistry*. 37:13486-13498.
- Stockley, P. G., N. J. Stonehouse, J. B. Murray, S. T. Goodman, S. J. Talbot, C. J. Adams, L. Liljas, & K. Valegård. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2512-2518.
- Uhlenbeck, O. C. (1990) *Nature*. 346:613-614.
- Valegård, K., J. B. Murray, P. G. Stockley, N. J. Stonehouse, & L. Liljas. (1994) *Nature*. 371:623-626.
- Varani, G., F. Aboul-ela, & F. H. T. Allain. (1996) *Prog. NMR Spectrosc.* 29:51-127.
- Wickner, R. B. (1996) *Microbiol. Rev.* 60:250-265.
- Williamson, D., & A. Bax. (1988) *J. Magn. Reson.* 76:174-177.
- Wimberly, B., G. Varani, & I. Tinoco, Jr. (1993) *Biochemistry*. 32:1078-1087.
- Woese, C. R., S. Winker, & R. R. Gutell. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:8467-8471.
- Wyatt, J. R., M. Chastain, & J. D. Puglisi. (1991) *Biotechniques*. 11:764-769.
- Yao, W., K. Adelman, & J. A. Bruenn. (1997) *J. Virol.* 71:2157-2162.

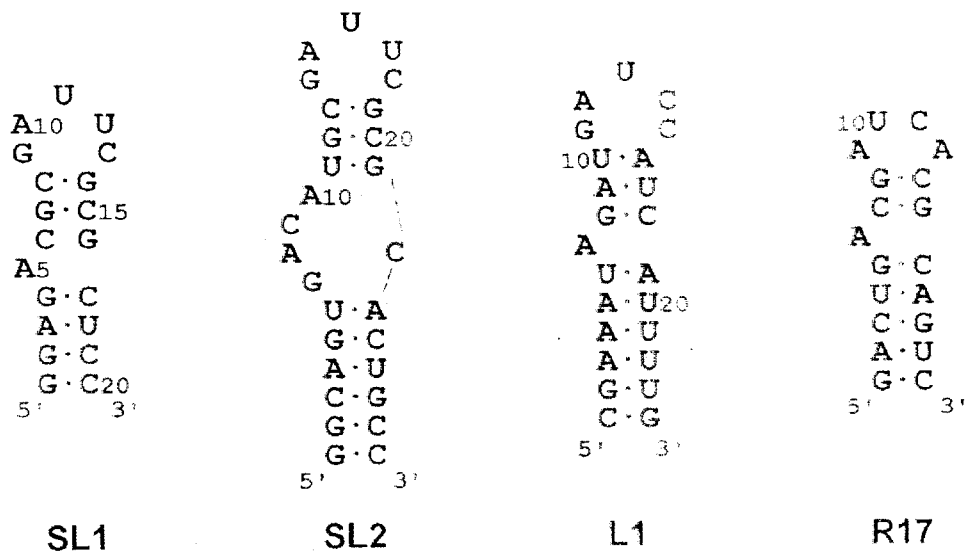


Fig. 4-1. ScV RNA의 VBS의 2차구조와 R17의 구조

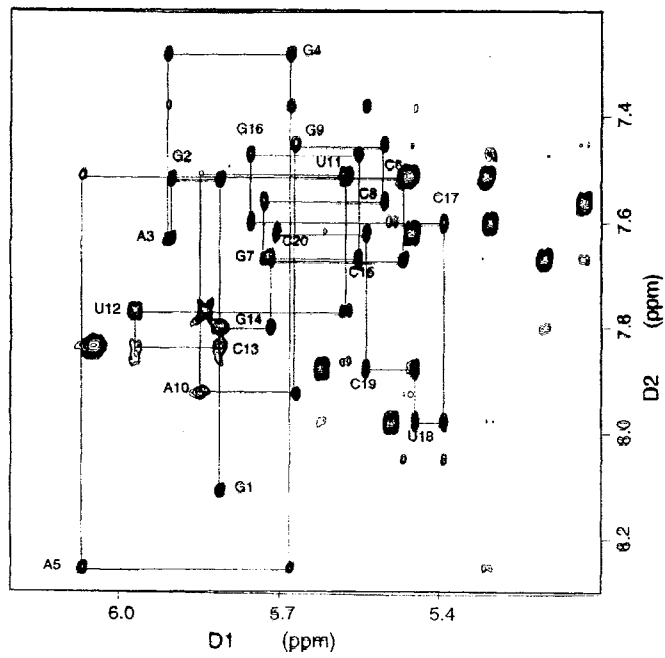


Fig. 4-2. SL1 RNA의 NOESY spectrum. Base-sugar walk를 표시하였다.

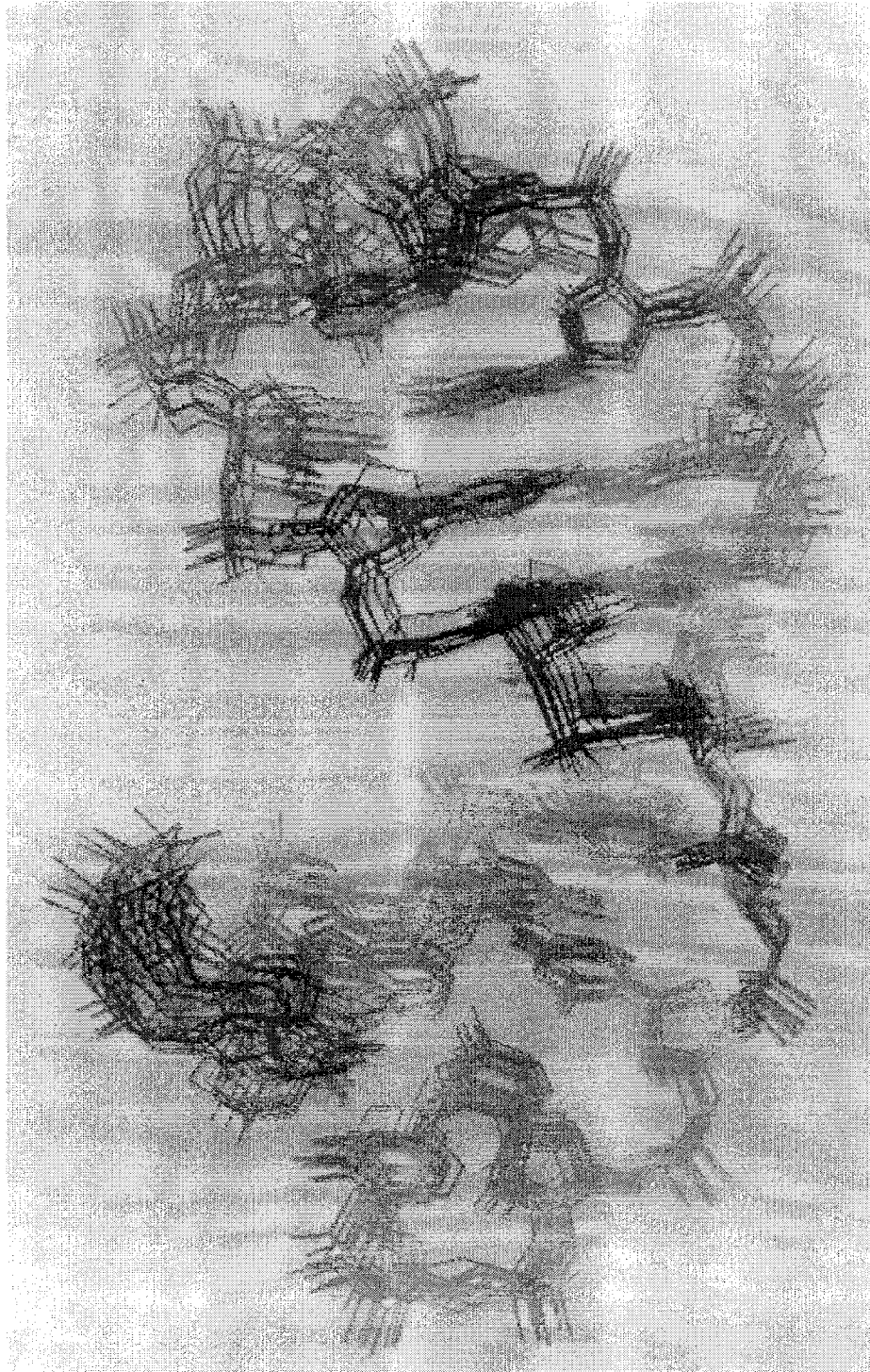


Fig. 4-3. SL1 RNA의 converged 구조. 11개의 구조를 superimpose 하였다.

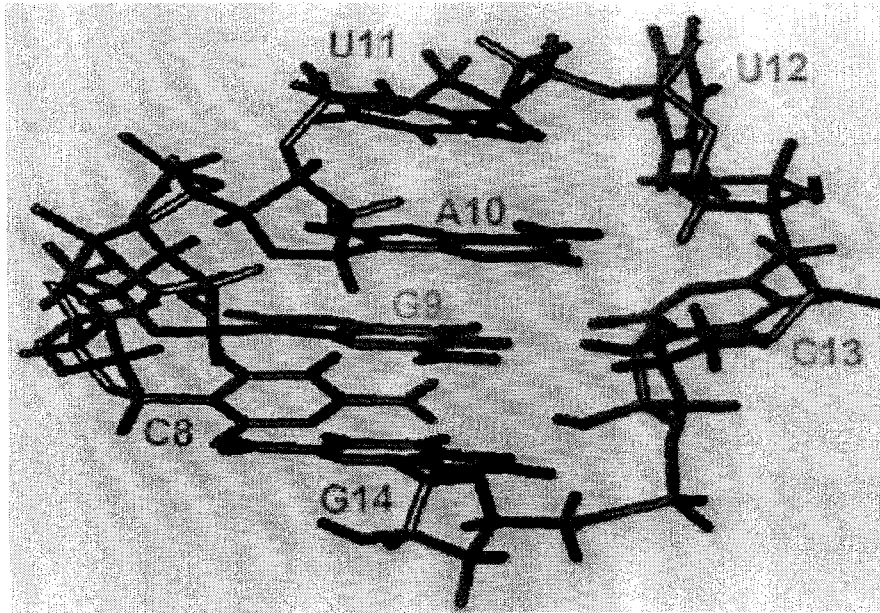


Fig. 4-4. SL1 RNA의 loop 부위의 구조. G9과 C13이 hydrogen bond를 형성하고 있고, U12와 C13은 minor groove로 shift되어 있다.

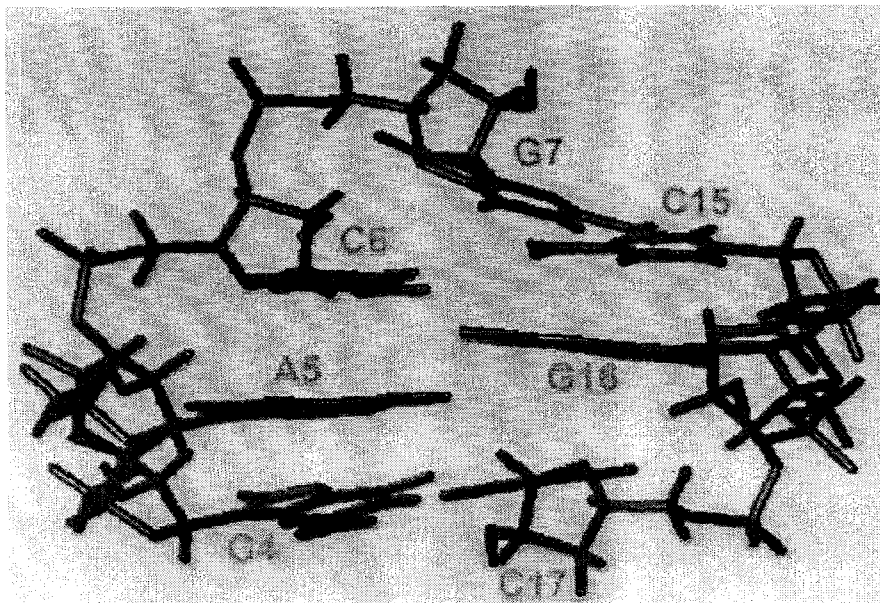


Fig. 4-5. SL1 RNA의 bulge 부위의 구조. A5가 stack-in 되어 있고, C6와 G16은 예상과 달리 Watson-Crick basepair를 형성하지 않는다.

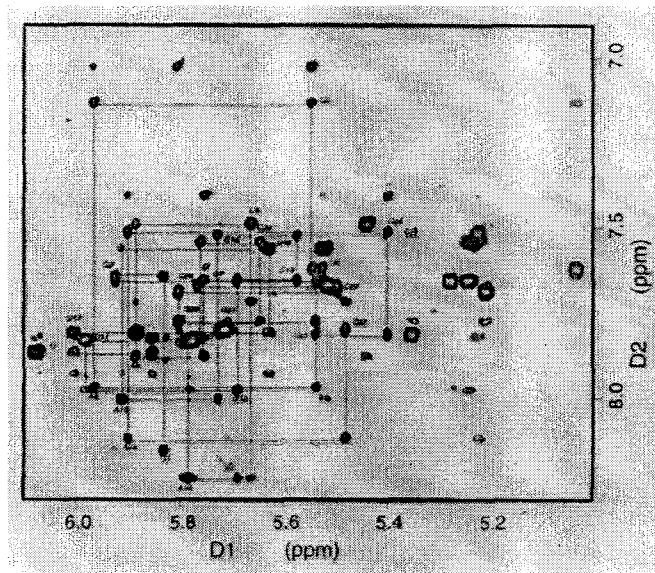


Fig. 4-6. SL2 RNA의 NOESY spectrum. Base-sugar walk를 표시하였다.



Fig. 4-7. SL2 RNA의 converged 구조. 11개의 구조를 superimpose 하였다.

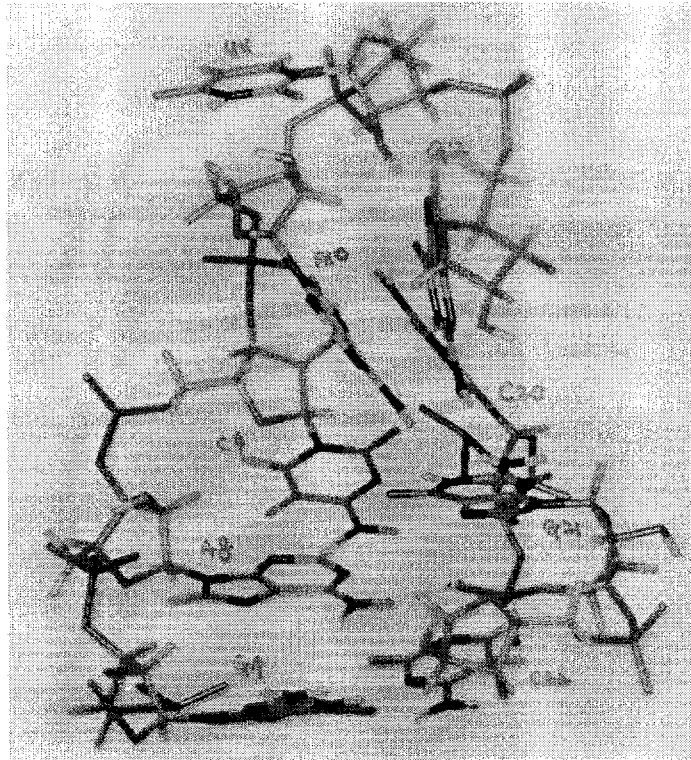


Fig. 4-8. SL2 RNA의 internal loop 구조. A10과 G12가 stack 되어있고, U11은 bulge out 되어있다. A8의 amino proton과 G21의 phosphate가 hydrogen bonding을 하고 있다.

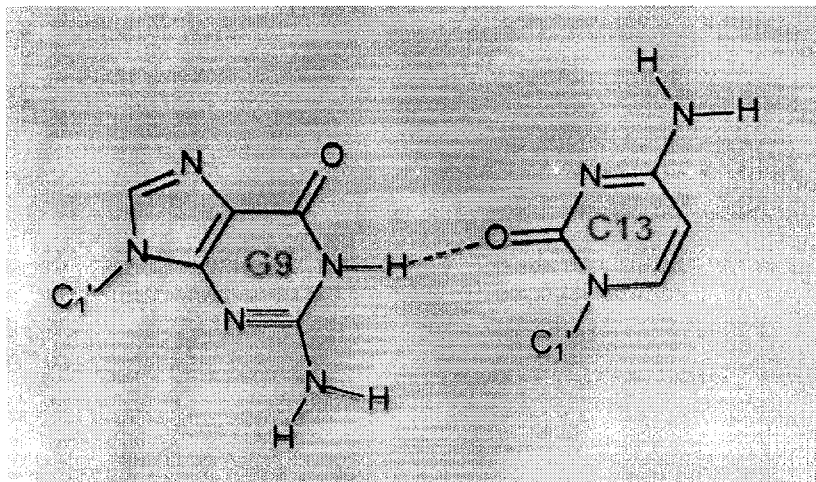


Fig. 4-9. SL1에서 G9과 C13의 hydrogen bond를 보여준다.

제4장 연구개발 결과의 활용 계획

최근 human genome project가 성공적으로 종료됨에 따라 전 세계적으로 structural genomics와 structural proteomics에 대한 열기가 고조되고 있다. 미국, 일본을 포함한 선진국은 대규모의 NMR 시설과 X-ray 시설을 투자하여 high-throughput 구조규명 project를 시작하였고 국내에서도 정부 주도 및 민간 산업체 주도 하에 다수의 생체분자 구조규명 사업을 기획하고 있다. 이러한 시점에서 본 연구개발 결과는 생체분자, 특히 RNA 구조규명과 신약개발에 즉각 활용될 수 있을 것이다. 본 개발 기술은 신약 등의 제품 후보물질 도출에 활용될 수 있다. 실제로 국내 및 국외 제약회사는 신약개발에 NMR과 X-ray 방법을 사용하고 있다. 본 과제에서 구조가 규명된 influenza virus RNA의 경우 독감치료제 개발에 활용될 수 있을 것이다. 또한 RNA 구조규명 기법이 확립되었으므로 HIV 등 여러 RNA virus의 genome을 target으로 공격하는 신약개발을 활성화시킬 수 있을 것이다. 따라서 structural genomics 등, 구조생물분야의 대규모 사업이 정부 차원에서 시급히 마련되어 post-genome 시대의 경쟁에서 우리나라도 선진국에 뒤지는 일이 없어야 할 것이다