

Structural and Functional Aspects of DNA Polymerase (Applications to DNA Sequencing)

Young Tae Kim

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan, 608-737, Korea

DNA Polymerase의 구조 및 기능 연구 (DNA 염기서열 결정에 응용)

金永泰

부산수산대학교 자연과학대학 미생물학과

I. Introduction

DNA가 생명체의 유전정보를 수용하는 물질임이 밝혀진 후, 지난 반세기 동안 유전정보의 복제, 전사, 발현 등에 대한 많은 생화학적, 유전학적 연구가 진행되어 왔다. 그 중에서도 생명체가 생명 현상을 유지하고 진화되어 오기 위해 필수적인 DNA 복제 과정은 정확하게 조절되어야 한다.

DNA 복제 과정은 *E. coli*에서 Human에 이르기까지 일반적인 복제 기작을 갖고 있어 DNA replication fork에서 각각의 DNA Polymerase, helicase/primase, DNA binding proteins를 비롯하여 많은 필수 및 보조 단백질들의 상호작용을 통하여 DNA를 복제하는 공통된 system을 형성한다.¹⁾

DNA 복제시 중추적 단백질은 DNA 합성을 수행하는 DNA polymerase이다. 따라서 DNA polymerase의 구조 및 기능에 대한 연구는 DNA polymerase의 중합반응에 대한 기작을 비롯하여 교정 및 수선기능에 대한 정보를 얻게 함으로써 복잡한 DNA 복제 기작을 이해하는 첩경이 된다. DNA polymerase의 구조와 기능에 대한 연구는 80년대 중반, 유전자를 cloning하고 대량 발현시킬 수 있는 분자 생물학적 실험의 발전으로 현재 생화학적, 유전학적 연구가 활발히 진행되고 있다.^{2~4)}

현재 DNA polymerase의 기능을 담당하는 domain인 polymerase 활성부위, 기질인 dNTP 결합자리, DNA 결합 부위, primer/template 인식부위, 복제 단백질들과의 상호작용을 하는 domain들에 대한 구조적 규명과 기능적 특성에 대한 연구가 생화학적 변형법, site-directed mutagenesis, 유전학적 분석법, NMR이나 X-ray 결정 분석을 통한 구조결정법 등을 통하여 활발히 진행되고 있다.

Bacteriophage T7의 유전자 복제과정에 관여하는 DNA polymerase를 비롯한 각 구성 요소들은 cloning되어 대량 발현되었고, 이렇게 얻은 다량의 필수 단백질들은 복제 기작에 있어서 단백질-단백질, 단백질-핵산 간의 상호작용들을 이해하는데 필요한 실험들을 가능케 할 뿐만 아니라 생체내에서의 유전자 복제과정을 이해하는데 요구되는 유전학적, 분자생물학적 system으로 활용하는데 적절하다.⁵⁾

Bacteriophage T7의 Gene 5 단백질은 T7 DNA polymerase로 Richardson group에 의해 처음으로 발견되었으며, *E. coli*의 12 KDa thioredoxin과 tight complex를 형성한다.^{6~9)} T7 DNA polymerase의 클로닝은 분자생물학의 새로운 장을 열어준 중요한 의미를 지닌다. 왜냐하면 DNA polymerase의 발현(expression)은 숙주에 toxic effect를 주어 숙주 세포가 죽기 때문에 대량 생산이 매우 어려웠다. 하지만 T7 RNA polymerase/promoter system

을 이용한 overexpression system의 개발은 toxic protein의 대량 생산을 가능케 하였다.²⁾ T7 DNA polymerase는 *E. coli* thioredoxin과 tight complex(~7nM)를 이복으로 T7 DNA polymerase를 아주 processive한 효소로 활성화시켜 준다.^{10~11)} T7 DNA polymerase의 high processivity에도 불구하고 자연 상태의 T7 DNA polymerase는 3'~5' exonuclease 활성을 갖는다.¹²⁾ 이와 같은 exonuclease 활성은 DNA 염기서열 분석에 많은 문제점으로 노출되었으나 T7 DNA polymerase의 대량 생산이 가능해짐으로 이 효소의 exonuclease 활성을 죽인 mutant T7 DNA polymerase의 개발도 가능해졌다. 이 변형된 T7 DNA polymerase는 exonuclease 활성에 관여하는 단백질 domain의 28개 아미노산기들을 분자생물학적 방법으로 절편시킴으로써 DNA polymerase 활성만을 가진 "High processive DNA polymerase"를 얻을 수 있었다. 이것의 상품명인 "Sequenase V. 1 and 2"(U.S.B.)로서 세계 각지의 분자생물학 실험중 유전자 염기서열 결정에 많이 이용되고 있다.^{13~16)}

본 연구에서는 T7 DNA polymerase의 구조적, 기능적

특성을 파악하고 DNA 염기서열 분석에의 응용 및 DNA 염기서열 결정을 위한 새로운 전략 및 최근연구 동향에 대해 기술하고자 한다.

II. History of Sequencing

Sequencing이란 protein, RNA, DNA와 같은 생체 고분자를 그 구성 최소단위로 결합서열을 결정하는 것을 의미한다. 1955년 F. Sanger에 의해 insulin의 아미노산 구성서열이 완성된 이후로 현대까지 많은 단백질의 아미노산서열이 결정되었다. DNA의 경우는 1966년 Richardson이 T7 DNA의 5'-말단 염기를 떼어 내는 것으로 시작되었으나,¹⁷⁾ 1970년대 중반까지 DNA 염기서열 결정은 여러 한계점으로 인하여 답보상태에 있다가 70년대 중반 이후에 개발된 2가지 방법에 의해 변혁을 일으켰다. 이 두 방법은 DNA polymerase를 이용한 dideoxy termination 방법과 화학적 분해 방법이다.^{18, 19)} Table 1에서 sequencing 기법의 progress를 정리하고 있다.

오늘날 dideoxy termination 방법은 화학적 분해 방법

Table 1. Progress in Sequencing

| Year | Protein | RNA | DNA | Number of residues | Laboratory |
|-------|--------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1935 | Insulin | | | 1 | (Evans) |
| 1945 | Insulin | | | 2 | (Sanger) |
| 1949 | Insulin | | | 9 | (Sanger) |
| 1955 | Insulin | | | 55 | (Sanger) |
| 1960 | Ribonuclease | | | 120 | (Moore and Stein) |
| 1965 | | tRNA _{Ala} | | 75 | |
| 1967 | | 5S RNA | | 120 | (Sanger) |
| 1966 | | | Phage T7 | 1 | (Richardson) |
| 1967 | | | Phage T7 | 2 | (Richardson) |
| 1968 | | | Phage λ | 12 | (Wu) |
| 1978 | | | Phage φ×174 | 5,386 | (Sanger) |
| 1981 | | | Phage T7 | 12,100 | (Dunn and Studier) |
| 1981 | | | Mitochondria | 16,569 | (Sanger) |
| 1982 | | | Phage λ | 48,502 | (Sanger) |
| 1983 | | | Phage T7 | 39,936 | (Dunn and Studier) |
| 1984 | | | Epstein-Barr virus | 172,282 | (Sanger) |
| ~1997 | | | <i>E. coli</i> | 4,000,000 | |
| ~2015 | | | Human | 4,000,000,000 | |

보다 아래와 같은 장점들에 의해 거의 독점적으로 사용된다. Dideoxynucleotide chain termination 방법은 화학적 분해 방법에 비해, (i) sample 준비시간과 sequencing 반응이 빠르며, (ii) autoradiography 방법이 간편하고, (iii) [α - 35 S] deoxynucleotide를 사용함으로써 autoradiograph 상의 방사능 scattering을 줄임으로 염기서열분석이 정확하고, (iv) 염기서열을 gel 상에서 4종의 염기를 각각의 lane에서 읽음으로 판독이 용이하고, (v) 형광기가 도입된 primer나 dideoxynucleotide를 이용함으로써 DNA sequencing 분석을 방사능 물질의 사용없이도 가능케 할 뿐만 아니라 자동화할 수 있고, (vi) DNA polymerase의 특이성에 따라 반응조건을 특성화함으로써 다양한 종류의 DNA 염기서열 결정을 가능케 하고 이와 같은 장점들은 DNA 염기서열 결정에 새로운 방법을 개발할 수 있다.

Dideoxynucleotide chain termination 방법은 DNA polymerase의 DNA 합성 효소 기작을 이용한다. DNA polymerase는 primer DNA의 3'-OH에 template DNA 상의 상보적인 염기(deoxynucleotides)를 중합함으로써 DNA를 합성한다. 따라서 DNA polymerase에 의해 중합되는 primer DNA는 template DNA를 주형삼아 새로운 DNA로 중합되고 이 중합되는 반응에 2', 3'-H를 갖고 있는 Dideoxynucleotides를 각기 부가반응을 시킴으로써 인해 고리

중합이 중단되고 이들 혼합중간체들을 크기에 따라 분리함으로써 DNA 염기서열을 결정할 수 있다.

1987년 이전까지는 dideoxy termination 방법에 대장균의 DNA polymerase I을 DNA sequencing 효소로 사용해 왔으나, DNA polymerase I은 생체내에서 DNA의 수선 기능을 주로 담당하는 바 중합진행도가 상대적으로 느리고 exonuclease 활성으로 인하여 DNA sequencing 기법의 향상과 신전략을 개발할 잠재성에 한계를 갖게 되었다(Table 2).

1987년에 Richardson 연구팀에 의해 T7 DNA polymerase가 단백질 공학적으로 변형 처리되어 sequencing을 위한 중합효소로 개발되었다.¹⁴⁾ T7 DNA polymerase는 T7 DNA의 복제에 중합효소로 중합진행도가 빠르고 생체내에서 DNA 복제에 단지 thioredoxin, Primase/Helicase, DNA결합 단백질을 필요로 하는 필수단백질로 이용한다.⁵⁾ 따라서 DNA 합성에 이들 단백질만이 요구되고, 이들 필수 단백질 또한 clone되어 대량정제가 되었기 때문에 T7 DNA polymerase의 기능과 특성을 밝히는 연구를 비롯, DNA 서열 분석에 유용한 복제 필수 단백질들을 이용한 미래의 새로운 기술개발을 위한 연구에 가장 좋은 중합효소로도 각광을 받고 있다. T7 DNA polymerase의 3'-5' exonuclease activity를 생화학적, 유전공학적 방법으로 제거하고

Table 2. Properties of DNA polymerase relevant to DNA sequence analysis

| Enzyme | 5'→3' exonuclease | 3'→5' exonuclease | Processivity (primed M13 DNA) | Macroscopic rate of synthesis | Discrimination against ddNTPs | Thermal stability |
|--|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| E. coli DNA polymerase I | + | +(low) | 10~30 | Fast(~100/sec) | High | - |
| E. coli DNA polymerase I large fragment(klenow fragment) | - | +(low) | 10~30 | Fast(~100/sec) | High | - |
| T7 DNA polymerase (T7 gene 5 protein) | - | +(high) | <10 | Very slow | Low | - |
| Native T7 DNA polymerase (T7 gene 5 protein/thioredoxin) | - | +(high) | 1000's | Fast(~100/sec) | Low | - |
| Modified T7 DNA polymerase (Modified T7 gene 5 protein /thioredoxin) | - | - | 1000's | Very fast (~400/sec) | Low | - |
| T4 DNA polymerase (T4 gene 43 protein) | - | +(high) | 10~30 | Fast(~100/sec) | Very high | - |
| Taq DNA polymerase | + | - | 50~100 | Fast(~100/sec) | High | + |
| Reverse transcriptase | - | - | 100~300 | Very slow (~4/sec) | Low | - |

DNA 염기서열에 최적의 중합효소로 사용되고 있고(Table 2), 이에 대해서는 다음 장에서 상세히 설명하고자 한다. 간단히 T7 DNA polymerase를 변형시킨 연구과정을 살펴보면, T7 DNA polymerase의 중합 진행도(processivity)를 높이는 필수 보조단백질은 *E. coli* thioredoxin이다.^{11, 12)} 이 특성을 DNA 염기서열 분석에 이용하기 위해서는 3'-5' exonuclease 활성을 제한하거나 제거할 필요가 있다.¹³⁾ Exonuclease 활성을 제거시킨 후 sequencing 반응을 억제하는 pyrophosphorolysis 효과가 있음을 발견하게 되었고, 이 억제효과도 반응조건을 조작함으로써 제거가 가능하게 되었다.²⁰⁾ T7 DNA polymerase는 metal ion에 따라 기질인 deoxynucleotides와 기질 유사체인 dideoxynucleotides에 대한 선택성에 차이를 보이고 Mg^{2+} 대신 Mn^{2+} 이온으로 치환했을 경우 기질 선택성이 없어져 dideoxynucleotides를 제한없이 incorporation 시킨다.¹⁶⁾ 이러한 sequencing 반응결과 생기는 DNA 합성체들은 gel상에서 단일 fluorophore와 단일 lane을 사용하는 자동화된 서열 분석으로의 새로운 연구를 제공한다.²⁰⁾ 앞으로의 연구는 polymerase의 활성부위에 대한 특성과, 그 필수단백질들에 초점을 맞추어 진행될 것이다. 그러한 정보는 DNA 염기서열 결정에 유용하지 못한 특성을 제거하고 바람직한 특징들은 향상시키기 위해 단백질을 조작하는데 이용될 것이다. 이들 연구들이 새로운 DNA polymerase와 새로운 sequencing 전략들을 개발하는데 중요한 정보를 제공할 것으로 예상된다.

III. Structure and Function of T7 DNA polymerase

A) T7 DNA polymerase

Phage T7이 *E. coli*에 감염할때에 새로운 DNA 중합효소 활성이 *E. coli* extract에서 나타난다.^{6, 21)} 이 중합효소는 T7 genome의 gene 5에 coding되어 있는 DNA polymerase로 gene 5가 변이된 phage는 성장할 수 없고, 이것은 T7 DNA 복제가 일어나지 않는 것으로 확인되었다.²²⁾ T7 DNA polymerase는 cloning되었고, *E. coli*에 toxic한 유전자를 발현시키기 위해 개발된 T7 RNA polymerase/promoter system에 기초한 expression system을 이용하여 대량 발현되었으며,^{2, 23)} 순수하게 정제되었다.¹²⁾ T7 DNA

중합효소는 1 : 1의 molar ratio로 80 KDa의 T7 gene 5 단백질과 12 KDa의 *E. coli* thioredoxin이 결합하는 혼합체로 구성된다.⁷⁻⁹⁾

Thioredoxin이 결합되지 않은 T7 gene 5 단백질은 processivity가 낮은 DNA polymerase이고, 1~16 nucleotide를 primer에 중합시킨 후 primer-template로 부터 해리된다. T7 phage가 감염된 상태에서 분리된 T7 DNA polymerase는 보조단백질인, 숙주의 thioredoxin과 결합된 형태이다. *E. coli*의 thioredoxin은 T7 gene 5 단백질과 강하게 결합하여, DNA polymerase의 processivity를 100배 이상 증가시킨다. *E. coli* thioredoxin은 분자량이 12 KDa이며 열에 안정한 단백질로 세포내에서 disulfide의 산화와 환원반응을 촉매하는 기능을 가진다.

두 단백질의 물리적 상호작용과 그 작용의 결과는 다음 두가지 이유로 해서 중요하다. 첫째, 복제기점(replication fork)에서 단백질-단백질 상호작용을 조사하는 시스템에 대한 모형과 processivity에 관계되는 분자기작을 제공하며, 둘째, thioredoxin과 결합 상태에서 보여주는 빠른 DNA 중합 진행도(processivity)는 이들 복합체(T7 DNA polymerase and thioredoxin)가 DNA 염기서열 결정 및 분석을 하는데 유용하게 응용될 수 있게 한다.^{13, 14)}

B) Functional domains of T7 DNA polymerase

다른 species의 DNA polymerase처럼 T7 DNA polymerase도 적어도 2개의 효소활성 부위를 갖고 있다. DNA 합성을 주도하는 polymerization domain과 3'-5' exonuclease domain이 생화학적, 유전학적 실험결과 밝혀졌으며 *E. coli* DNA polymerase I과는 polymerase 및 exonuclease 활성부위가 동일한 것으로 밝혀지고 있다. Exonuclease 활성부위는 amino terminal에 위치하고 polymerase 활성 domain은 C-terminal 부분의 crevice 내에 위치한다. 이 두 활성부위들에 대한 집중적인 연구는 DNA 서열분석에 쓰이는 다른 DNA polymerases들의 활성 개발에도 필수적이다. 따라서 gene 5 protein을 DNA 염기서열 분석에 응용하기 위한 유전공학적 노력은 exonuclease부위와 processivity를 높이는 부위인 thioredoxin binding site에 집중되어 왔다. T7 DNA polymerase는 *E. coli* DNA polymerase I의 large fragment(Klenow)와 기능적인 부분의 염기서열이 거의 동일하며 전체적인 sequence

에 있어서도 구조적 상동성이 존재한다. Klenow fragment는 X-ray 구조결정법에 의해 3차 구조가 유일하게 밝혀진 DNA polymerase이다(그림 1). 따라서 T7 DNA polymerase와 Klenow fragment 사이에 염기 서열상의 상동성을 보이기 때문에 Klenow fragment의 구조를 통하여 T7 DNA polymerase의 아미노산 서열이 잘 보존된 기능부위들을 규정하는 노력을 해 왔다. X-ray 구조 결정법에 따르면, Klenow fragment는 605개 아미노산의 polypeptide로, N-terminal에 약 200개의 아미노산으로 구성되는 small domain과 C-terminal에 약 400개의 large domain으로 구성된다.²⁴⁾ Large domain은 dNTP와 DNA가 결합하는 5'-3' polymerase 활성부위이고 small domain은 3'-5' 활성부위이다. 두 활성부위는 서로 분리되어 있고 각각의 활성은 거의 독립적이다. Polymerase 활성 domain에는 DNA 결합부위, dNTP 결합자리, polymerase 활성자

리가, 3'-5' exonuclease 활성부위에는 dNMP, exonuclease 활성자리가 위치하는 것으로 추정되고 각 활성부위들은 chemical modification, cross-linking, affinity labelling과 같은 생화학적 방법들에 의해 확인되고 있다. Polymerase domain의 경우 위의 실험 방법에 의하면 Arg 682, Lys 758, Tyr 766과 His 881이 *E. coli* polymerase I의 dNTP 결합부위로 확인되었다. 이 네 잔기 모두는 *Thermus aquaticus*의 polymerase I, *Streptococcus pneumoniae*의 DNA polymerase, T7 gene 5 protein의 polymerase domain의 아미노산 상동성이 잘 보존되었기 때문에 이들의 dNTP 결합자리로 추정된다.²⁵⁻²⁷⁾ *In vitro* mutagenesis에 의한 실험결과에 의하여 이들 아미노산 잔기들이 polymerase domain의 활성부위임이 거듭 확인되었다.

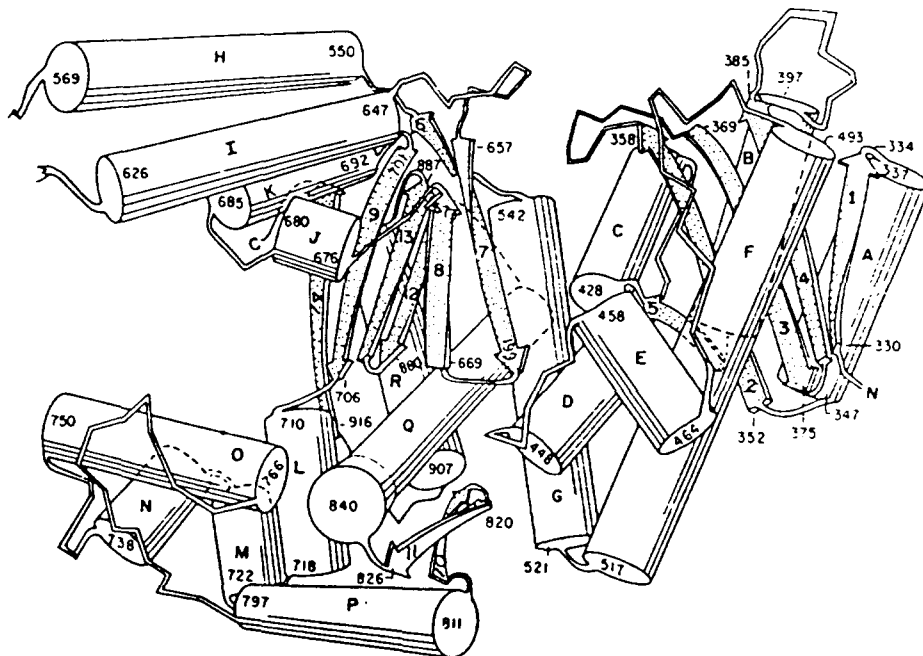


Fig. 1. Schematic representation of the three-dimensional polypeptide fold of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I. Regions of polypeptide that form alpha helix are represented by cylinders and those that form beta sheet by arrows. Both sheets and helices are numbered from the N-terminus. The break indicated between helices I and H is the position of a partially disordered 50 residues(not shown). The division between large and small domains is in the loop between helices F and G(Ollis *et al.*, 1985).

C) T7 DNA Polymerase-thioredoxin complex

T7 gene 5 protein은 *E. coli* thioredoxin과 1:1로 강하게($K_m = 7 \times 10^{-9} M$) 결합하여 DNA polymerase의 활성을 촉진시킨다.^{10, 28, 7, 8, 29} Thioredoxin이 핵산과 직접 결합하거나 DNA에 대사에 직접적인 효소 기능을 갖고 있지 않으나 T7 gene 5 단백질과 결합하여 T7 gene 5의 기능을 구조적으로 보존함으로써 T7 phage에 있어 필수 단백질이다. Thioredoxin은 gene 5 protein과 직접 상호작용하여 highly processive한 DNA polymerase를 만들어 준다. 이들의 단백질-단백질 상호작용에 대한 결합 위치가 유전학적으로 최근에 밝혀졌다.³⁰

Thioredoxin은 ribonucleotide reductase의 수소 수용체로서 *E. coli*에서 발견된 열에 안정한 단백질이다.³¹ Thioredoxin의 구조적 유전자, *trxA*는 *E. coli* 연관 지도상에서 89.7분에 위치한다.^{32, 33} *E. coli* thioredoxin을 coding하는 *trxA* gene은 cloning되었고, nucleotide 서열도 결정되었다.³⁴⁻³⁷

Thioredoxin은 -Cys-Gly-Pro-Cys- 이 환성중심에 redox-active half-cysteines로 존재하는 단백질이고, redox 반응에 참여한다.^{38, 39} 산화된 thioredoxin의 3차구조는 1.68Å의 X-ray 회절에 의해 결정되어졌고,^{40, 41} thioredoxin의 환원된 상태의 3차원적인 용액 구조는 NMR에 의해 결정되어졌다.⁴² T7 gene 5 protein과 결합된 형태의 thioredoxin은 활성부위에 있는 cysteine의 구조적 특성이 보존되어야 한다. 산화된 형태의 thioredoxin은 gene 5 단백질과 결합하지 않는다.⁴³ Thioredoxin의 중요 역할은 gene 5 단백질에 1:1로 결합하여 gene 5 단백질의 processivity를 증가시킨다.¹² M13 DNA를 template로 사용하여 T7 gene 5 단백질의 processivity를 측정된 결과, thioredoxin이 결합하지 않은 상태에서는 15초 후 단지 1개에서 16 nucleotides를 중합하는 반면, thioredoxin이 결합한 상태에서는 processivity가 수 백배 증가하였다.¹¹ 이는 thioredoxin이 DNA 복제기점의 protein-DNA complex를 안정화시킴으로서 processivity를 높여주는 것으로 알려져 있다.

T7 DNA polymerase와 thioredoxin이 DNA template/primer와 결합하는데 필요한 최소단위를 그림 2에서 설명한다.

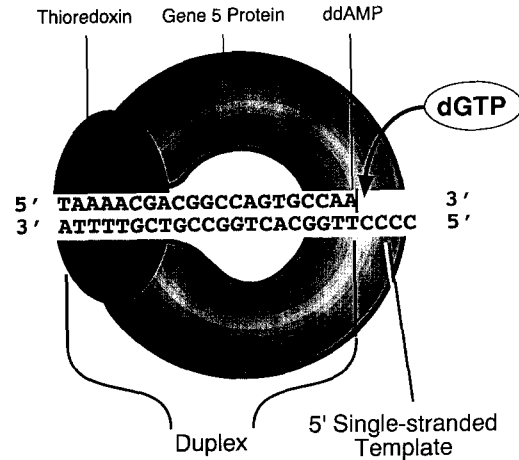


Fig. 2. Minimal requirements of primer/template at the T7 DNA polymerase(gene 5 protein+thioredoxin).

D) T7 DNA polymerase와 T7 gene 4 protein의 상호작용

Gene 4는 두 종류의 단백질(63 KDa, 56 KDa)을 coding하고 있으며 각각의 C-terminal은 같으나 N-terminal이 다른 단백질로 이것은 gene 4가 두개의 initiation codon을 갖기 때문이다.^{44, 45} Gene 4 protein은 helicase인 동시에 primase의 기능도 겸한다. 두가지 기능은 single-strand DNA에 결합하는 능력과 한 방향(5'-3')으로만 이동이 가능하고⁴⁶, NTP의 가수분해 결과 생기는 energy를 이용한다.^{47, 48} Gene 4 protein의 helicase 활성은 T7 DNA polymerase가 유전자 복제시 double-stranded DNA를 template로 이용할 수 있게 한다.^{45, 49, 50} 또한 gene 4 protein은 primase activity를 갖고 있어 single-stranded DNA에 4개의 염기로 된 RNA primer를 합성시켜 준다.⁵¹⁻⁵⁴ 56 KDa와 63 KDa의 gene 4 protein도 클로닝되어 대량 발현되었고, 정제된 단백질을 이용하여 helicase와 primase의 활성을 비롯한 구조와 기능에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.⁵⁵⁻⁵⁸

Gene 4 protein의 primase 활성에 대한 초기의 연구들은 세포에 감염된 phage로부터 정제된 56, 63 KDa 단백질의 혼합물로 수행되었다. 그들의 연구들은 gene 4 protein은 template DNA 상의 3'-CTGGG/T-5'과 3'-

CTGTG-5'의 sequence를 인식하여 pppACCC/A와 pp-pACAC인 tetranucleotides primer의 합성을 촉매한다.^{46,53)} 최근의 연구는 primer 합성은 오직 63 KDa gene 4 protein에 의해서만 촉매된다는 것을 나타내고, 그리고 trinucleotide 서열인 3'-CTG-5'을 인식하는데 필수적이고 충분함을 나타낸다. 56 KDa protein으로 부터 잃어버린 7 KDa 지역은 63개 아미노산 잔기를 포함하는데, 주기적으로 4개의 떨어진 위치에 cysteines이(Cys-X₂-Cys-X₁₅-Cys-X₂-Cys) 배치한다. 이와 같은 특이적 서열 형태는 DNA에 결합하는 몇몇 단백질의 Zn-Finger domain과 일치한다.⁵⁹⁾

56, 63 KDa gene 4 proteins는 *in vivo*와 *in vitro* 둘다에서 homodimers와 heterodimers를 형성할 수 있다.⁶⁰⁾ Gene 4 proteins와 gene 5 protein 혼합체의 물리적 상호작용을 시험하기 위해 설계된 연구는 gene 4 proteins와 T7 DNA polymerase 사이의 상호작용과 gene 4 proteins에 의해 합성되는 oligoribonucleotide primer 사이에 안정한 결합을 유도하는 것이 gene 4 proteins의 역할을 나타냈다.^{61,62)} 또한 Kim과 Richardson의 최근 연구에서는 단일가닥 DNA 결합 단백질인 T7 gene 2.5 단백질이 T7 DNA polymerase와 gene 4 proteins와 특이적으로 상호작용하는 것을 보이는데, 이 상호작용을 통하여 DNA 합성을 10배 촉진한다.^{63~65)}

E) T7 DNA polymerase와 gene 2.5 단백질의 상호작용

Gene 2.5 protein이 T7 DNA 복제와 성장에 필수단백질임이 최근 본 연구자에 의해 유전학적, 생화학적 방법에 의해 밝혀졌다.^{64,65)} Gene 2.5 protein은 single-stranded DNA에 결합하는 단백질(26 KDa)이며,⁶⁶⁾ T7 DNA polymerase, primase/helicase와 직접 단백질 상호작용을 통하여 이들 효소의 기능을 활성화 및 촉진시킨다.⁶³⁾

Gene 2.5를 분자생물학적 방법으로 변이(mutation)시킨 phage와 plasmids를 construction하여 생체내에서 DNA 복제기능과 전사기능을 조사한 결과 gene 2.5 protein은 Bacteriophage T7의 유전자 복제, 재조합, 수선에 있어서 필수단백질임이 밝혀졌다.⁶⁴⁾ Gene 2.5 protein은 cloning과 대량발현을 통해서 분리, 정제, 동정되었다.⁶⁶⁾ Gene 2.5 protein이 Bacteriophage T7의 DNA replication에 필수단백질로 밝혀짐에 따라 gene 2.5 protein의

구조와 기능에 대한 연구 또한 심층적으로 진행되었고 그 결과 이 단백질은 용액상태에서 dimer로 존재하고 single-stranded DNA에 선택적으로 결합하며 DNA 복제나 재조합, 수선에 관여하는 단백질들과 직접 단백질-단백질 상호작용을 한다.^{63~68)} 특히 carboxyl-terminal 부분이 단백질-단백질 상호작용에 직접 관여함이 C-terminal을 절편(deletion)시킨 gene 2.5 변이체를 이용하여 증명되었다.⁶⁵⁾

Gene 2.5 protein의 구조적 특징은 작은 size의 분자량(26 KDa/subunit)에 비해 복합적 기능(multiple function)을 가지고 있다. 대표적인 구조적 특징은 DNA와 결합하는 부분, C-terminal acidic domain, NTP binding site, subunit-interaction 등으로 구분되고 있으나 이들 domain에 대한 자세한 구조적, 기능적 연구는 규명되어 있지 않다. T7 DNA replication에 필수 단백질로 관여하는 gene 2.5 단백질은 DNA 복제 단백질들과 상호작용을 하며 그들 단백질의 기능을 촉진, 조절하는 기능을 갖고 있다.^{63~65)} Native gene 2.5 protein의 경우 T7 DNA polymerase와 약 ~1 μ M 범위의 해리상수(Kd) 값을 가지는 결합력으로 상호작용하며 T7 DNA polymerase의 효소 활성을 10배 정도 촉진시킨다.⁶³⁾

F) Modified T7 DNA polymerase

Native T7 DNA polymerase(T7 gene 5 protein and thioredoxin)은 DNA를 polymerization 시키는데 high processivity를 보이나 single 또는 double-strand DNA에 대한 exonuclease activity가 높다. 높은 수준의 exonuclease 활성은 생화학적, 유전공학적 방법에 의해 exonuclease의 활성을 제거할 수 있다.^{13~16)} 이와같이 exonuclease의 활성을 제거한 것을 Modified T7 DNA polymerase라 하고 이 변형된 enzyme은 DNA 염기서열 결정에 Sequenase라는 상품명으로 널리 이용되고 있다.

Exonuclease 활성이 없는 modified T7 DNA polymerase는 자연상태의 T7 DNA 중합효소와 다음과 같은 특징으로 구별된다.

- (i) Hair-pin과 같은 DNA 상의 2차 구조에 의한 nucleotides의 중합화를 방해하는 것을 제거하고,
- (ii) 높은 속도로 nucleotides를 중합화하고(high processivity),

- (iii) 낮은 농도의 dNTPs를 이용하여 nucleotides를 중합화하고,
- (iv) dATP 대신에 dATP 유사물질(etheno-dATP, ddATP, etc)도 잘 incorporation하게 하고,
- (v) primer의 3'-OH에 nucleotides를 polymerization 하는 능력이 탁월하다.¹³⁻¹⁵

위와 같은 특성을 갖도록 T7 DNA polymerase를 변형시키는 방법으로 생화학적 방법에 의해 exonuclease do-

main의 metal binding site를 oxidation에 의한 damage를 줌으로써 exonuclease activity를 제거하거나,^{13,14} *in vitro* mutagenesis에 의해 exonuclease 활성을 죽이는 방법이 있다.^{15,16} 이 방법은 exonuclease 활성부위가 His-123를 중심으로 존재하기 때문에 His-123 단일 아미노산에서부터 이를 둘러싸는 28개 아미노산을 deletion 하는 방법에 의해 exonuclease activity를 10⁻⁶% 이하로 제거할 수가 있었다(그림 3).

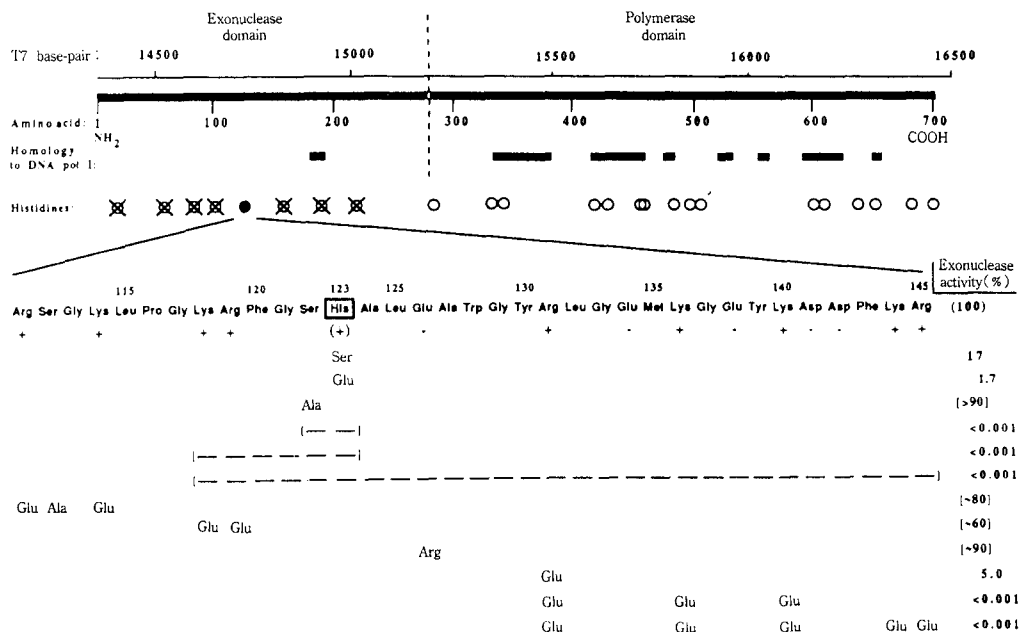


Fig. 3. Schematic map of T7 gene 5 showing the mutations. The nucleotide positions of gene 5 in T7 are shown at the top; immediately below are the amino acid residue positions in gene 5 protein (Dunn and Studier, 1983). The sequences having the strongest homology to *E. coli* DNA polymerase I are indicated (Ollis *et al.*, 1985b). The dashed vertical line separated the exonuclease and polymerase domains, determined by analogy to the domains determined for DNA polymerase I. The positions of the 24 histidine residues in gene 5 protein are indicated by (○). × is superimposed on those histidine residues that were changed to serine residues without affecting the exonuclease activity. ●, at His¹²³, corresponds to the only histidine residue in which modification to serine resulted in a significant reduction in exonuclease activity. The region of His¹²³ 12 expanded below, showing the amino acid sequence from Arg¹¹¹ to Arg¹⁴⁵. The positions of the mutations in the region of His¹²³ are shown. The exonuclease activity of each mutant on uniformly-labeled ssDNA relative to that of native T7 DNA polymerase is shown at the right: exonuclease activities in brackets are extrapolated from the polymerase activities assayed in extracts in the presence of εdATP.

DNA polymerase가 dideoxynucleotides를 incorporation 시키는데 망간 이온의 효과를 조사해 보면, T7 DNA 중합효소와 *E. coli* DNA 중합효소 I에 의한 ddNMP의 incorporation은 Mg^{2+} 보다 Mn^{2+} 가 촉매로 사용될때 더 효과적이다.¹⁶⁾ Mg^{2+} 를 Mn^{2+} 로 바꾸면 DNA polymerase I과의 ddNMPs의 구별을 100배 감소시키고 T7 DNA polymerase와는 4배 감소시킨다. Mn^{2+} 와 T7 DNA 중합효소와 함께 사용하면, ddNMPs와 dNMPs는 같은 속도로 incorporation된다. Mn^{2+} 는 furanose, 염기, 그리고 인산 연결에서의 결합형태 때문에 다른 유사물질 nucleotides들과의 선택성을 줄여 준다. 금속 완충기인 isocitrate는 DNA 합성의 촉매에 효과적인 $MnCl_2$ 농도의 범위를 넓혀준다.

화학적으로 또는 유전학적으로 조작된 gene 5 protein-trx 혼합체는 DNA sequencing에 적합한 몇가지 특성들을 가지고 있다.¹⁴⁾ Modified gene 5 단백질은 trx와 결합하여 high processivity를 가진다. 조작에 의해 3'-5' exonuclease 활성은 감소되거나 또는 제거된다. 효소는 band 압축의 제거에 사용된 dideoxynucleotides나 nucleotide 유사물질들에 대한 선택성이 없다. 더우기, Mn^{2+} 존재하에서는 ddNMPs에 대한 구별을 없애주기 때문에 polyacrylamide gel 상에서 인접한 bands의 compression을 없애준다. 따라서, ddNMP로 끝난 절편은 길이가 수십에서 수천의 nucleotides의 범위 전체를 통해 단일 형태의 방사능 강도를 가진다. Hair-pin에서의 종결 혹은 2차 구조 장애 때문에 생기는 background도 없다. Sequencing 반응상의 pyrophosphorolysis의 효과에 의해 sequencing 반응이 억제되는 현상도 없어진다.

그림 4에서는 modified T7 DNA polymerase를 사용하여 DNA 염기서열을 결정한 예를 보여준다.

IV. DNA Sequencing에서의 DNA polymerase

이번 단락에서는 DNA polymerase들을 사용해서 dideoxy chain termination 방법을 이용하는 DNA sequencing에 관해 살펴본다.

Dideoxynucleotide chain termination 방법은 사슬-중단 nucleotide(ddNTPs)가 incorporation될때까지 primer를 중합하고, 주형을 annealing시키는 DNA polymerase의

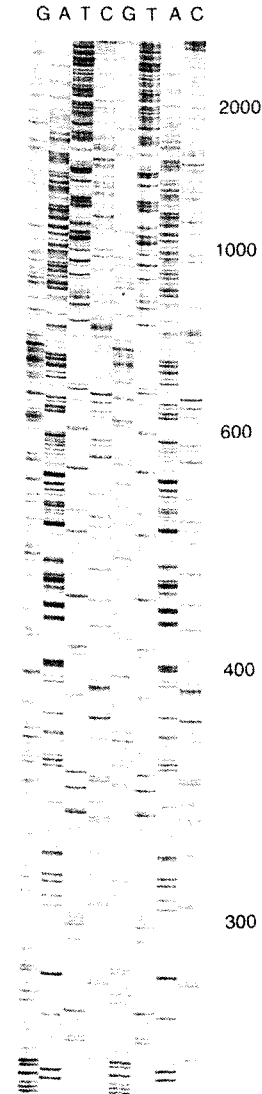


Fig. 4. DNA sequence generated with modified T7 DNA polymerase(Sequenase V2.0)

활성에 기초한 것이다. 일반적으로, 4개의 분리된 DNA 합성반응을 시킨 후, 각각의 반응을 ddNTPs를 사용하여 사슬을 중단시키고, 각각 반응들을 통해 합성된 DNA 절편들을 전기영동에 의해 분리한다. DNA polymerase의 특성들은 DNA 염기서열을 분석하는데, 중요한 역할을 한

다. 이론적으로 말하면, sequencing에 사용되는 DNA polymerase는 (i) nucleotide 유사물질(ddNTPs)에 대해 선택성을 보이면 안되고, (ii) exonuclease 활성이 결핍되어야 하고, (iii) 높은 진행도(high processivity)를 가지며, (iv) 신속하게 nucleotides를 중합하고, (v) 작은 oligonucleotide primer를 이용해야 하며, (vi) 비교적 고온에서도 활성을 나타내야 하고, 그리고 (viii) 이중 가닥의 DNA를 이용하여야 한다.

DNA polymerase가 위의 조건들을 잘 충족시킬수록 DNA 염기서열 결정에 잘 응용될 수 있다. 따라서 이들 조건들을 항목별로 살펴보면 아래와 같다.

A) Nucleotides 유도체에 대한 선택성

DNA sequencing에 사용하기 위해 DNA polymerase는 nucleotide 유도체들을 선별하는 선택성이 없어야 sequencing 반응에 중요하다. DNA 염기서열 분석에 가장 일반적으로 사용하는 nucleotide 유사체는 dideoxynucleotides 이고 전기 영동상에 나타나는 compression bands를 해독하기 위해 deoxyinosine 5'-triphosphate(dITP)나 2'-deoxy-7-deazoguanosine 5'-triphosphate(dc⁷GTP)와 같은 유도체로 이용된다.

Dideoxynucleotides - ddNTPs와 같은 대부분의 유사물질들은 원래 기질인 nucleotides보다 DNA polymerase에 의해 덜 효과적으로 incorporation된다. T4 DNA polymerase와 같은 몇 효소들은 DNA sequencing에 사용될 수 없을 정도로 ddNTPs를 구별하여 substrate로 이용될 수 없다. *E. coli* DNA polymerase I 은 dNTP를 substrate로 사용하는 것보다 ddNTP에 대해 1000배 정도 덜 incorporation하지만,⁶⁹⁾ 이는 ddNTPs를 dNTPs보다 훨씬 많이 사용하여 sequencing에 사용될 수 있다. *Thermus aquaticus*로부터의 DNA polymerase(*Taq* DNA polymerase) 역시 dNTP를 사용하는 것보다 훨씬 덜 효과적으로 ddNTPs를 incorporation시킨다.⁷⁰⁾ T7 DNA polymerase는 단지 몇배 정도만 ddNTPs를 구별한다.¹⁴⁾ 따라서 T7 DNA polymerase를 sequencing 반응에 사용함으로써 다양한 종류의 nucleotide 유도체를 이용할 수 있다.^{15, 16)}

T7 DNA polymerase에 의한 ddNMPs와 *E. coli* DNA polymerase I의 incorporation은 Mn²⁺가 촉매에 사용되

었을 때 더 효과적이다.¹⁶⁾ Mn²⁺과 T7 DNA polymerase를 함께 사용함으로써, ddNMPs와 dNMPs는 실제적으로 같은 속도로 incorporation된다. 이와같은 선택성의 10% 이하로, polyacrylamide gel상에서 인접한 bands의 세기로 나타나기 때문에 sequencing gels의 판독을 용이하게 한다. 따라서 sequencing bands를 nucleotides의 종류에 상관없이 고른 세기의 bands로 DNA 서열을 나타내주므로 새로운 종류의 DNA 염기서열 분석에 응용할 새로운 연구가 가능하게 한다.²⁰⁾

Gel 전기영동 후의 각 peak의 band 세기를 측정함으로써, 다른 비율로 4개 ddNTPs를 포함하는 sequencing 반응에서 DNA 서열을 결정하는 방법을 개발했다. 이 과정은 polyacrylamide slab gel 전기영동에 의해, 그리고 모세관 gel 전기영동에 의해 형광적으로 표시된 nucleotide 유도체를 사용하여 자동으로 염기서열을 읽을 수 있도록 하고 있다.^{20, 71, 72)}

Band compression을 제거하기 위한 nucleotide 유도체들 - Gel 상의 compression된 band는 그 부분에 해당하는 서열을 읽지 못하는 문제점을 일으키며, polymerase의 활성과는 무관하다.^{18, 73, 14)} 이들은 주로 GC 염기쌍을 함유하는 2차 대칭의 서열들에서 발생한다. 압축은 이례적으로 빠른 전기 이동을 초래하면서, RNA 구조가 안정한 hairpin 구조를 형성하는 곳에서 시작된다. dGTP, dc⁷GTP, dITP의 유사물질들은 그러한 염기쌍 형성으로 부터 생기는 gel compression들을 제거하는데 이용된다.^{73-75, 14)} dc⁷GTP에서 guanine의 N-7 위치에 methine moiety가 치환되고, Guanosine의 exocyclic 아미노산 그룹이 걸림된 Inosine은 약하게 cytidine과 수소 결합을 하기 때문에 그와 같은 band compression을 제거한다.⁷⁶⁾ T7 DNA polymerase는 Mn²⁺만의 존재하에서는 2배, Mg²⁺의 존재하에서 dITP를 10배 구별한다.¹⁶⁾

형광으로 표시된 nucleotides - DNA sequencing에 사용되는 다른 유사물질 종류는 형광으로 표시된 ddNTPs이다.^{77, 78)} *E. coli* DNA polymerase I은 사용하기에 너무 약하게 이들 유사물질들을 incorporation한다. T7 DNA polymerase는 이들 유사물질들을 상당히 효과적으로 incorporation하고,⁷⁸⁾ 그리고 그 효과는 Mn²⁺을 사용하면 최대로 향상된다.¹⁶⁾ *Taq* DNA polymerase 역시 이들 유

사물질을 incorporation한다. 그러나, 그 incorporation은 각 유사물질을 고농도로 사용해야 하며, 효과적이지 못하다.

B) Exonuclease activity

대부분의 DNA polymerase들은 3'-5' exonuclease 활성을 갖는다.¹¹⁾ *In vivo*에서 3'-5' exonuclease 활성의 기능은 염기쌍 형성을 하지 못한 발단을 자르기 위한 것이며, 따라서 중합화동안 발생하는 오류를 수정하기 위한 '교정' 기능을 제공한다. Exonuclease 활성은 몇가지 이유에서 DNA 서열분석에 불리하다. (i) 사슬을 중단시키는 nucleotide의 incorporation이 exonuclease에 의해 감소시키고 2차 구조를 갖는 DNA sequence에서 반응의 정지를 증가시킬 수 있고 (ii) nucleotide 유사물질들의 구별을 증가시킬 수 있고, (iii) 마지막으로, exonuclease 활성의 존재는 반응 혼합물에 기본적으로 존재해야 하는 dNTPs의 Km을 증가시킨다.

C) Processivity

Processivity는 DNA template/primer complex에 DNA polymerase가 결합한 채 nucleotides를 중합하는 DNA polymerase의 활성능력이다. high processivity를 갖는 polymerase는 primer에 수천개의 nucleotide들을 incorporation시킨다. 따라서 DNA sequencing에 있어서 high processivity는 DNA polymerase의 중요한 요건이다. 또한 high processivity를 가지면 DNA polymerase가 정지될 수 있는 DNA template 상에 2차 구조를 형성하는 기점에서 template로 유리되지 않고 polymerization을 진행시킬 수 있다.

DNA polymerase I의 large fragment는 평균 10개의 nucleotides가 incorporation된 후 template DNA로 부터 해리되는 processivity가 낮은 효소이다.^{79-81, 12)} 따라서 template DNA로 부터 잘 유리되는 낮은 processivity를 갖는 DNA polymerase는 DNA 염기서열 결정을 모호하게 하고 background bands를 그만큼 많이 나오게 한다.

반면에, T7 DNA 중합효소는 수천개의 nucleotides의 진행도를 유도하고,¹²⁾ DNA template/primer complex에 강하게 결합한다.¹¹⁾ 따라서 낮은 진행도의 효소에 관련된 문제점들의 대부분은 T7 DNA polymerase를 사용함으로

극복되었다. Taq DNA 중합효소는 원래 고도의 진행도를 가진 것으로 기록되었으나,⁷⁰⁾ 최근의 실험결과에 의하면 단지 50~60 nucleotides의 진행도를 보여준다.⁸²⁾

D) Rate of polymerization

Phosphodiester 결합 형성의 속도가 높을수록 DNA sequencing에 사용되는 DNA polymerase로 유용하다. 만약, 2차 구조가 없는 DNA template/primer라면 합성 속도가 높을수록 많은 nucleotides들을 incorporation할 것이다.

T7 DNA polymerase와 *E. coli* DNA polymerase I은 37°C에서 초당 대략적으로 400개의 nucleotides의 속도로, DNA sequencing에 역시 사용되는 효소인 Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase보다 100배 더 빠르게 nucleotides의 incorporation을 촉매한다. Taq DNA 중합효소는 70°C에서 60 nucleotides/sec의 속도로 nucleotides를 중합화한다.⁷⁰⁾

E) Oligonucleotide primers

DNA polymerase는 nucleotides의 첨가를 위해 3'-OH를 갖는 primer를 필요로 한다. 짧은 primer를 이용하는 DNA 중합효소는 DNA sequencing에 보다 유용하다. 현재 사용되는 15~20 염기 primer 대신에, 이 길이의 반의 primer를 사용한다면, primer를 만드는데 화학합성의 시간과 비용을 감소시킬 것이다. 더욱 중요한 것은 8개 이하의 길이의 primer를 사용함으로써 primer walking으로 알려진 새로운 DNA 염기서열 결정법에 primer library로 사용될 수 있어 Human genome project를 비롯한 21대 유전자의 염기 서열 결정에 이용될 수 있다.⁸³⁾

Template DNA에 annealed된 연속적인 hexamers의 가닥을 사용하는 새로운 sequencing 방법이 modified T7 DNA polymerase를 사용하여 개발되었다.^{84, 85)} T7 DNA 중합효소는 상대적으로 짧은 primer를 이용한다.⁸⁶⁾ 또한 이들 complex를 안정화시키기 위해 T7 gene 2.5 protein 혹은 T7 primase를 사용하면 짧은 primer를 DNA template에 안정화시킬 새로운 전략을 개발할 수 있다.

F) Pyrophosphorolysis

모든 DNA polymerase들의 특성인 pyrophosphorolysis

는 각 dNTPs가 incorporation된 후 부산물로 생기는 pyrophosphate에 의해 DNA 중합반응이 억제될 받는 것이다. T7 DNA polymerase로부터 exonuclease 활성을 제거하자 DNA sequencing에서 pyrophosphorolysis의 중요성이 부각되었다.²⁰⁾ T7 DNA polymerase에 의한 pyrophosphorolysis는 DNA sequencing gel상에서 DNA dideoxynucleotide로 끝난 DNA 혼합물들의 분해를 야기한다. 하지만, 이 반응은 dideoxynucleotide로 끝난 DNA 절편의 분해를 막는 pyrophosphatase 효소의 첨가로 극복된다.²⁰⁾

G) Elevated temperatures

높은 온도에서 기능을 갖는 열안정 DNA polymerase의 능력은 DNA 서열 분석에 유용한 특성들을 제공한다.⁷⁰⁾ Taq DNA polymerase는 높은 온도와 낮은 염농도에서 활성이 높다. 높은 온도로 인해 template DNA 상의 hair pin과 같은 2차 구조들이 풀려 DNA polymerase가 2차 구조에서 정지되던 약점을 극복할 수 있다. 더 중요한 잇점은 열에 안정한 DNA polymerase이기 때문에 DNA 합성을 주기적으로 반복하는 DNA amplification시 주기가 끝날 때마다 DNA polymerase를 첨가해 주지 않아도 DNA 합성이 일정주기 동안 반복되어 DNA를 다량 증폭할 수 있다. 따라서 polymerase chain reaction(PCR) 방법을 가능케 했고 이때 ddNTPs를 사용함으로써 인해 dideoxy sequencing을 PCR로 수행할 수 있도록 되었다.^{87, 88)}

Cycle sequencing은 특정 DNA sequencing을 위해 적은 양의 enzyme 농도와 purity가 낮은 효소를 사용할 수 있는 잇점들을 제공하는 반면에, 이 방법의 현재 결점은 특별히 Taq DNA 중합효소와 같은 열안정 효소는 modified T7 DNA polymerase가 갖는 위에서 열거했던 여러가지 장점들이 결여되어 있다는 것이다.

H) Double-stranded DNA

Double-stranded DNA를 single-stranded DNA vector로 clone하거나 exonuclease를 사용, 한가닥 DNA를 제거하여 외가닥 DNA로 만드는 것보다 double-stranded DNA를 직접 sequencing하는 것이 편리하다. Circular double-stranded DNA를 linearized시킨 후 heat denatu-

ration 또는 alkali에 의해 2중 DNA를 바로 변성시켜 외가닥으로 만들어 DNA template로 이용하는 방법들이 사용되었다.^{89~95)} 최근에는 PCR을 사용, double-stranded DNA를 직접 sequencing하고 있다.

인 용 문 헌

1. Kornberg, A., and Baker, T. A., *DNA Replication, 2nd Ed.*(Freeman and Co., San Francisco) (1992).
2. Tabor, S., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 1074~1078(1985).
3. Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G., and Salas, M., *Cell*, **59**, 219~228(1989).
4. Beese, L. S., Derbyshire, V., and Steitz, T. A., *Science*, **260**, 352~355(1993).
5. Richardson, C. C. *Cell*, **33**, 315~317(1983).
6. Grippo, P., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **246**, 6867~6878(1971).
7. Modrich, P., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **250**, 5508~5514(1975a).
8. Modrich, P., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **250**, 5515~5522(1975b).
9. Mark, D. F., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 780~781(1976).
10. Alder, S., and Modrich, P., *J. Biol. Chem.*, **254**, 11605~11614(1979).
11. Huber, H. E., Tabor, S., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **262**, 16224~16232(1987).
12. Tabor, S., Huber, H. E., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **262**, 16212~16223(1987).
13. Tabor, S., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **262**, 15330~15333(1987a).
14. Tabor, S., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 4767~4771(1987b).
15. Tabor, S., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **262**, 6447~6458(1989a).
16. Tabor, S., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 4076~4080(1989b).
17. Richardson, C. C., *J. Mol. Biol.*, **15**, 49~61(1966).

18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463~5467(1977).
19. Maxam, A. M., and Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 560~564(1977).
20. Tabor, S., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **265**, 8322~8328(1990).
21. Oey, S. L., Stätling, W., and Knippers, R., *Eur. J. Biochem.*, **23**, 497~504(1971).
22. Studier, F. W., *Virology* **39**, 562~574(1969).
23. Tabor, S., in *Current Contents in Molecular Biology*, eds(1990).
24. Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., and Steitz, T. A., *Nature*, **313**, 762~766(1985a).
25. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saikai, R. K., Myambo, K., Drummond, R., and Gelfand, D. H., *J. Biol. Chem.*, **264**, 6427~6437(1989).
26. Lopez, P., Martinez, S., Diaz, A., Espinosa, M., and Lacks, S. A., *J. Biol. Chem.*, **264**, 4255~4263(1989).
27. Ollis, D. L., Kline, C., and Steitz, T. A., *Nature*, **313**, 818~819(1985b).
28. Hori, K., Mark, D., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **254**, 11591~11604(1979).
29. Huber, H. E., Russel, M., Model, P., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **261**, 15006~15012(1986).
30. Himawan, J., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9744~9778(1992).
31. Laurent, T. C., Moore, E. C., and Reichard P., *J. Biol. Chem.*, **239**, 3436~3444(1964).
32. Mark, D. F., Chase, J. W., and Richard, C. C. *Molec. Gen. Genet.*, **155**, 145~152(1977).
33. Russel, M., and Model, P., *J. Bacteriology*, **157**, 526~532(1984).
34. Tabor, S., Huber, H. E., and Richardson, C. C., In *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems*(Eds. A. Holmgren, C. Branden, H. Jornvall, and B. Sjoberg), *Raven Press, N. Y.*, pp. 285~300(1986).
35. Russel, M., and Model, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 29~33(1985).
36. Lunn, C. A., Kathju, S., Wallace, B. J., Kushner, S. R., and Pigiet, V., *J. Biol. Chem.*, **259**, 10469~10474(1984).
37. Lim, C-J., Geraghty, D., and Fuchs, J. A., *J. Bact.*, **163**, 311~316(1985).
38. Holmgren, A., Branden, C., Jornvall, H., and Sjoberg, B., *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems*, Raven Press, N. Y.(1986).
39. Holmgren, A., *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 237~271(1985).
40. Holmgren, A., Soderberg, B-O., Eklund, H., and Branden, C-I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2305~2309(1975).
41. Katti, K. S., LeMaster, D. M. and Eklund, H., *J. Mol. Biol.*, **212**, 167~184(1990).
42. Dyson, H. J., Gippert, G. P., Case, D. A., Holmgren, A., and Wright, P. E., *Biochemistry*, **29**, 4129~4136(1990).
43. Adler, S., and Modrich, P., *J. Biol. Chem.*, **258**, 6956~6962(1983).
44. Dunn, J. J., and Studier, F. W., *J. Mol. Biol.*, **166**, 477~535(1983).
45. Hinkle, D. C., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **250**, 157~185(1975).
46. Tabor S., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 205~209(1981).
47. Kolodner, R., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 1525~1529(1977).
48. Matson, S. W., Tabor, S., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **258**, 14017~14024(1983).
49. Kolodner, R., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **253**, 574~583(1978).
50. Matson, S. W., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **258**, 14009~14016(1983).
51. Romano, L. J., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **254**, 10476~10482(1979a).
52. Romano, L. J., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **254**, 10483~10491(1979b).
53. Nakai, H., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **261**,

- 15208~15216(1986a).
54. Nakai, H., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **261**, 15217~15224(1986b).
 55. Berstein, J. A., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 369~400(1988a).
 56. Berstein, J. A., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **263**, 14891~14899(1988b).
 57. Mendelman, L. V., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **261**, 23240~23250(1991).
 58. Mendelman, L. V., Notarnicola, S., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 10638~10642(1992).
 59. Pavletich, N. P., and Paco, C. O., *Science*, **252**, 809~817(1991).
 60. Patel, S. S., Rosenberg, A. H., Studier, F. W., and Johnson, K. A., *J. Biol. Chem.*, **267**, 15013~15021(1992).
 61. Nakai, H., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **263**, 9818~9830(1988a).
 62. Nakai, H., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **263**, 9931~9939(1988b).
 63. Kim, Y. T., Tabor, S., Churchich, J. E., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **267**, 15022~15031(1992b).
 64. Kim, Y. T., and Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, in press(1993a).
 65. Kim, Y. T., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **268**, in press(1993b).
 66. Kim, Y. T., Tabor, S., Bortner, C., Griffith, J. D., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **267**, 15032~15040(1992a).
 67. Kim, Y. T., and Churchich, J. E., *J. Biol. Chem.*, **264**, 15751~15753(1989a).
 68. Kim, Y. T., and Churchich, J. E., *Eur. J. Biochem.*, **181**, 397~401.
 69. Atkinson, M. R., Deutscher, M. P., Kornberg, A., Russell, A. F., and Moffatt, J. G., *Biochemistry*, **8**, 4897~4904(1969).
 70. Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., and Brow M. A. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9436~9940(1988).
 71. Swerdlow, H., Zhang, J. Z., Chen, D. Y., Harke, H. R., Grey, R., Wu, S. L., Dovichi, N. J., and Fuller, C., *Anal. Chem.*, **63**, 2835~2841(1991).
 72. Chen, D., Harke, H. R., and Dovichi, N. J., *Nucleic Acids Research*, **20**, 4873~4880(1992).
 73. Gough, J. A., and Murray, N. E., *J. Mol. Biol.*, **166**, 1~19(1983).
 74. Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F., *Nucleic Acids Research*, **14**, 1319~1324(1986).
 75. Mills, D. R., and Kramer, F. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 2232~2235(1979).
 76. Inman, R. B., and Baldwin, R. L., *J. Mol. Biol.*, **166**, 477~535(1964).
 77. Prober, J. M., Trainer, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., and Baumeister, K., *Science*, **238**, 336~341(1987).
 78. Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., and Wilson, R. K., *Nuc. Acid. Res.*, **20**, 2471~2483(1992).
 79. McClure, W. R., and Jovin, T. M., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4073~4080(1975).
 80. Bambara, R. A., Uyemura, D., and Choi, T., *J. Biol. Chem.*, **253**, 413~423(1978).
 81. Das, S., and Fujimura, R. K., *J. Biol. Chem.*, **56**, 229~262(1979).
 82. Abramson, R. D., Stoffel, S. and Gelfand, D. H., Abstracts, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, New Orleans, Louisiana, June, 1990, pp. A2293.
 83. Studier, F. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 6917~6921(1989).
 84. Kieleczawa, J., Dunn, J. J., and Studier, F. W., *Science*, **258**, 1787~1791(1992).
 85. Kotler, L. E., Zevin-Sonkin, D., Sobolev, I. A., Beskin, A. D., and Ulanovsky, L. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 6917~6921(1989).

- Sci., U. S. A.*, **90**, 4241(1993).
86. Masamune, Y., and Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.*, **252**, 8498~8503(1977).
87. Carothers, A. M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D., and Chasen, L. A., *Biotechniques*, **7**, 494~499 (1989).
88. Murray, V., *Nuc. Acid. Res.*, **17**, 8889(1989).
89. Smith, M., Leung, D. W., Gillam, S., and Astell, C. R., *Cell*, **16**, 753~761(1979).
90. Hong, G. F., *Bioscience Reports*, **1**, 243~252(1981).
91. Hong, G. F., *Bioscience Reports*, **2**, 907~912(1992).
92. Wallace, R. B., Johnson, M. J., Suggs, S. V., Miyoshi, K., Blatt, R., and Itakurs, K., *Gene*, **16**, 21~26(1981).
93. Guo, L. H., Yang, R. C. A., Wu, R., *Nucleic Acids Research*, **11**, 5521~5540(1983).
94. Haltiner, M., Kempe, T. and Tijan, R., *Nucleic Acids Research*, **13**, 1015~1025(1985).
95. Chen, E. J., and Seeburg, P. H., *DNA*, **4**, 165~170 (1985).

회원 모집

지역학술조직의 새로운 시도인 부산생명과학연구회에 동참하지 않으시렵니까?

회원가입신청은 생명과학지에 첨부된 회원가입신청서를 이용하시면 되겠습니다.

본 회의년회비는 정회원이 10,000원, 학생회원이 5,000원, 협찬회원이 150,000원, 특별회원이 100,000원입니다.

본 연구회는 무한한 잠재력과 역량을 가지신 여러분의 협조를 필요로 합니다.