

Herpes Simplex Virus Type 1 Protease의 발현 및 분리 정제

한국화학연구소 의약활성연구실, 충남대학교 생물학과¹, 연세대학교 생물학과²
배판기 · 팽진욱 · 김지현 · 김해수 · 백상기¹ · 정인권² · 이종교*

=Abstract=

Expression and Purification of Herpes Simplex Virus Type 1 Protease

Pan Kee Bae, Jin Wook Paeng, Jee Hyun Kim, Hae Soo Kim,
Sang-Gi Paik¹, In Kwon Chung² and Chong-Kyo Lee*

Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Taejon 305-600, Department of Biology, Chungnam National University, Taejon¹,
Department of Biology, Yonsei University, Seoul², Korea

An attractive target for anti-herpes chemotherapy is the herpes simplex virus 1 (HSV-1) protease encoded by the UL26 gene. HSV-1 protease is essential for DNA packaging and virus maturation. To perform high throughput for potent inhibitors, the efficient production of larger amounts of highly purified enzyme and protease activity assay method must be established. In this report, expression in *E. coli* and purification of the protease gene of HSV-1 strain F was investigated. The protease gene was cloned pET28, and the nucleotide sequence of protease catalytic domain of HSV-1 compared strain F with other strains (KOS and CL101). In these results the F strain was different in base sequence. However, the amino acid sequence was identical. The HSV-1 protease was purified with His-tagged affinity column. The analysis of HSV-1 protease activity was performed by high performance liquid chromatography.

Key Words: Herpes simplex virus type 1, Protease gene, Nucleotide sequence analysis, HPLC

서 론

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)은 human herpesvirus의 하나이며, 약 150 kb 정도의 이중가닥으로 되어 있는 선상구조를 가진 DNA바이러스로서 G+C 농도가 약 70% 정도이다 [17]. HSV는 포유류의 점막, 피부에 감염하여 증식 후 신경조직으로 이동하고 잠복상태로 남아 있는 것으로 잘 알려져 있다 [2,10]. 잠복감염된 바이러스는 스트레스나 UV 또는 다른 자극 등에 의해 재활성이 일어나 처음 감염부위에 재발병이 일어난다 [1,

접수 : 1999년 9월 6일

*; Corresponding author: Chong-Kyo Lee, Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600 Korea. Tel: (042) 860-7412, Fax: (042) 861-4246, E-mail: ckyolee@pado.kriect.re.kr

24]. HSV-1은 단순포진, 각막염 등의 질병뿐 아니라 지속적인 약물투여로 치료하지 않을 경우 70% 이상의 높은 사망률이 알려진 뇌염을 일으키기도 한다. 현재까지 herpesvirus 치료제로 개발된 대부분이 핵산 유도체들로서 그 자체로는 약효를 나타내지 못하고 활성화 과정을 거친 후 바이러스의 유전자 합성을 저해한다 [6,7,11]. 그러나 이들 핵산 유도체만으로는 완벽한 치료효과를 가질 수 없기에 항 herpes 화학요법제의 새로운 치료제로 protease 저해제개발이 관심을 끌고 있다. Herpesvirus는 viral capsid assembly와 maturation에 관여하는 serine protease [13,15] 유전자를 가지고 있다

[8,14,27]. HSV-1 protease (UL26)는 intermediate capsid에서 발견되었고 viral particle 형성과정에서 assembly 단백질 ICP35 (UL26.5)와 protease 자체에서 단백질 가수분해가 일어난다 [8,14,22,26]. UL26 유전자는 두 개의 프로모터를 가지고 있는데, 하나는 635개 아미노산을 코드하고 있는 완전한 UL26 산물이고, 다른 하나는 UL26.5 유전자의 프로모터로서 329개 아미노산을 코드하고 있으며 ICP35를 생산한다 [4,15,18,20]. ICP35는 UL26의 C-말단 아미노산 서열과 동일하고 protease의 기질로서 이용되어지며 [14,17], HSV-1 복제 때 DNA가 포함되지 않은 B capsid에 많은 양이 존재하므로서 [21,25] bacteriophage의 scaffolding protein과 유사한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [9]. HSV-1 protease는 release site (R site, Ala²⁴⁷/Ser²⁴⁸)와 maturation site (M site, Ala⁶¹⁰/Ser⁶¹¹)의 절단부위가 있는 전구체로서 발견되어 진다 [5,23]. Protease에 의해 R site가 절단되어지면 전구체로부터 protease catalytic domain이 분리되고 [12], M site도 절단되어 전구체로부터 C-말단의 25개 아미노산이 제거된다 [5,14]. HSV-1이 세포에 감염한 다음 복제되어질 때 B capsid에 DNA packaging에 관여한다. 즉, protease는 DNA packaging과 virus maturation에 관여한다 [8,16,19].

본 연구에서는 HSV-1 protease를 클로닝하여 염기서열을 결정하였고 *E. coli*에서 발현시켜 단백질을 분리 정제하였다. 정제되어진 효소를 가지고 생쥐에 복강투여하여 다항원성 항체를 만들었고 효소의 기질에 대한 활성도를 측정하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 플라스미드, 세균, 바이러스

HSV-1 protease의 발현을 위해 pET 28(a) (Novagen)를 이용하였고 재조합된 플라스미드를 *E. coli* BL21에 삽입하여 형질전환시켜 단백질을 발현시켰다. 바이러스는 ATCC에서 F strain을 구입하여 이용하였다.

2. 바이러스 유전자 분리

Vero세포에 바이러스를 5 M.O.I./cell로 접종하고 배양한 다음 80%의 세포가 cytopathic effect (CPE)를 나타냈을 때 세포와 배양액을 회수한 다음 3번 얼렸다 녹여 세포를 깨뜨린 후 원심분리하였다.

상등액을 회수하여 다시 12,000 rpm으로 2 시간 원심분리하여 침전된 바이러스를 500 μ l의 lysis buffer (0.5% SDS, 9 mM EDTA, 10 mM Tris · HCl, pH 7.5)에 부유시켰다. 37 $^{\circ}$ C에서 한 시간 배양한 다음, 한 번 phenol로, 두 번 phenol/chloroform으로, 한 번 chloroform으로 유전자를 추출한 후 에탄올 침전법으로 유전자를 회수하였다. 유전자를 50 μ l의 TE (10 mM Tris · HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)액에 부유시킨 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3. Protease 유전자의 클로닝

HSV-1 strain F 유전자중에서 UL26를 PCR로 클로닝하기 위해 HSV-1 KOS strain [3]을 주형으로 하여 두 개의 primer를 제작하였다. 각각의 primer는 *Eco* RI site와 *Not* I site가 있었다. DNA 염기서열을 결정하기 위해 3 개의 primer를 제작하였다. 분리한 바이러스 유전자중 protease 유전자를 pET 28(a)에 클로닝하기 위해 PCR system (Deltacycler1TM system, Ericomp사)을 이용하여 증폭하였다. 증폭된 protease 유전자와 플라스미드를 제한 효소 *Eco* RI과 *Not* I로 절단하고 ligation하여 재조합 플라스미드를 만들었다. 이를 다시 *E. coli* BL21에 삽입하여 형질전환시켰고 이를 확인하기 위해 플라스미드 DNA를 분리하여 agarose gel에서 확인하였다.

4. DNA 염기서열 결정

[³⁵S]-dATP나 silver 염색법 (Promega)를 이용한 dideoxy법 [23]을 이용하였다. HSV-1 strain KOS를 주형으로 한 sequencing primer를 이용하여 재조합 플라스미드의 염기서열을 결정하였는데, 전기영동은 6% urea/PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하였다.

5. Protease의 발현과 분리 정제

재조합 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli* BL21를 배양하여 발현시켜 분리정제하였다. 세포를 30 μ g/ml Kanamycin이 들어 있는 Luria-Bertani 배지에서 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였고 600 nm에서의 흡광도 0.3~0.4 일때 0.1 mM IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galacto-pyranoside)를 첨가하여 protease 발현을 유도하였고 30 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 배양하였다. 단백질을 분리 정제하는 모든 과정은 4 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 배양한 세포를 원심분리한 후 침전물을 초음파로 분쇄하여 His-Tagged affinity chromato-

graphy로 protease를 분리 정제하였다. 정제되어진 단백질을 확인하기 위해 sodium dodecyl sulfate (SDS)/PAGE, Western blot을 하였고, 단백질 정량은 spectrophometer로 A_{280}/A_{260} 비율을 측정하여 정량했다.

6. 마우스 항 protease 다가혈청 제조

25 μ g 이상의 분리 정제된 protease를 complete Freund's adjuvant (GIBCO)와 1:1로 섞은 후 마우스 복강에 주사하였다. 두 주일마다 한 번씩 4 번 주

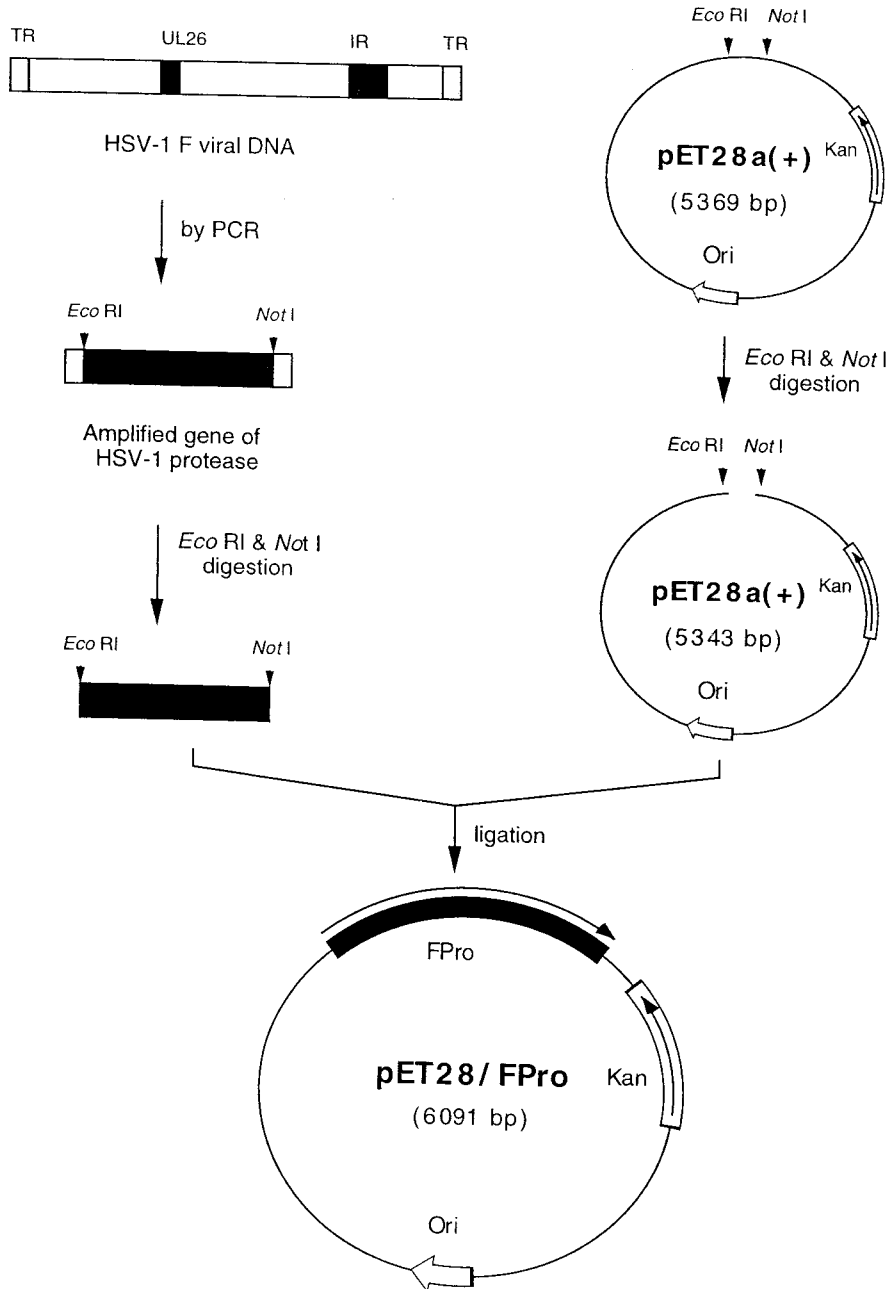


Figure 1. Construction of pET28-protease recombinant plasmid, pET28-FPro.

배판기 등: Cloning of HSV-1 Protease

F	1	:	ATGGCAGCCGATGCCCCGGGAGACCGGATGGAGGAGCCCCTGCCAGACAGGGCCGTGCC	*
CL101	1	:	ATGGCAGCCGATGCCCCGGGAGACCGGATGGAGGAGCCCCTGCCAGACAGGGCCGTGCC	
KOS	1	:	ATGGCAGCCGATGCCCCGGGAGACCGGATGGAGGAGCCCCTGCCAGACAGGGCCGTGCC	
F	61	:	ATTTACGTGGCTGGGTTTTTGGCCCTGTATGACAGCGGGACTCGGGTGAGTTGGCAITG	*
CL101	61	:	ATTTACGTGGCTGGGTTTTTGGCCCTGTATGACAGCGGGACTCGGGCGAGTTGGCAITG	
KOS	61	:	ATTTACGTGGCTGGGTTTTTGGCCCTGTATGACAGCGGGACTCGGGCGAGTTGGCAITG	
F	121	:	GATCCGGATACGGTGCCTGCGCCCTGCCCTCCGGATAACCCACTCCCGATTAACGTGGAC	*
CL101	121	:	GATCCGGATACGGTGCCTGCGCCCTGCCCTCCGGATAACCCACTCCCGATTAACGTGGAC	
KOS	121	:	GATCCGGATACGGTGCCTGCGCCCTGCCCTCCGGATAACCCACTCCCGATTAACGTGGAC	
F	181	:	CACCCGCTGGCTGCGAGGTGGGGCGGGTGCCTGGCCGTGGTCGACGACCCCCCGGGCCG	
CL101	181	:	CACCCGCTGGCTGCGAGGTGGGGCGGGTGCCTGGCCGTGGTCGACGACCCCCCGGGCCG	
KOS	181	:	CACCCGCTGGCTGCGAGGTGGGGCGGGTGCCTGGCCGTGGTCGACGACCCCCCGGGCCG	
F	241	:	TTTTTTGTGGGACTGATCGCCTGCGTGCAACTGGAGCGCGTCTCGAGACGGCCGCCAGC	*
CL101	241	:	TTTTTTGTGGGCTGATCGCCTGCGTGCAACTGGAGCGCGTCTCGAGACGGCCGCCAGC	*
KOS	241	:	TTTTTTGTGGGACTGATCGCCTGCGTGCAACTGGAGCGCGTCTCGAGACGGCCGCCAGC	
F	301	:	GCTGCGATTTTCGAGCGCCGCGGCCCGCCCTCTCCCGGAGGAGCGCCTGTGTACCTG	
CL101	301	:	GCTGCGATTTTCGAGCGCCGCGGCCCGCCCTCTCCCGGAGGAGCGCCTGTGTACCTG	
KOS	301	:	GCTGCGATTTTCGAGCGCCGCGGCCCGCCCTCTCCCGGAGGAGCGCCTGTGTACCTG	
F	361	:	ATCACCACCTACCTGCCCTCGGTCTCCCTGGCCACAAAACGCTGGGGGGCGAGGCGCAC	
CL101	361	:	ATCACCACCTACCTGCCCTCGGTCTCCCTGGCCACAAAACGCTGGGGGGCGAGGCGCAC	
KOS	361	:	ATCACCACCTACCTGCCCTCGGTCTCCCTGGCCACAAAACGCTGGGGGGCGAGGCGCAC	
F	421	:	CCCGATCGCACGCTGTTCGCGCACGTGCGCGTGTGCGCGATCGGGCGGGCCCTCGGCACT	*
CL101	421	:	CCCGATCGCACGCTGTTCGCGCACGTGCGCGTGTGCGCGATCGGGCGGGCCCTCGGCACT	*
KOS	421	:	CCCGATCGCACGCTGTTCGCGCACGTAGCGCTGTGCGCGATCGGGCGGGCCCTTGGCACT	
F	481	:	ATCGTACCTACGACACCGGTCTCGACGCCGCCATCGCGCCCTTTCCGCCACCTGTGCGCG	*
CL101	481	:	ATCGTACCTACGACACCGGTCTCGACGCCGCCATCGCGCCCTTTCCGCCACCTGTGCGCG	*
KOS	481	:	ATCGTTACCTACGACACCGGTCTCGACGCCGCCATCGCGCCCTTTCCGCCACCTGTGCGCG	
F	541	:	GCGTCTCGCGAGGGGGCGGGGCGACTGGCCGCCGAGGCCGAGCTCGCGCTGTCCGGACGC	*
CL101	541	:	GCGTCTCGCGAGGGGGCGGGGCGACTGGCCGCCGAGGCCGAGCTCGCGCTGTCCGGGCGC	*
KOS	541	:	GCGTCTCGCGAGGGGGCGGGGCGACTGGCCGCCGAGGCCGAGCTCGCGCTATCCGGACGC	
F	601	:	ACCTGGGCGCCCGCGGTGGAGGCGCTGACCCACACGCTGCTTTCCACCGCCGTTAACAAAC	
CL101	601	:	ACCTGGGCGCCCGCGGTGGAGGCGCTGACCCACACGCTGCTTTCCACCGCCGTTAACAAAC	
KOS	601	:	ACCTGGGCGCCCGCGGTGGAGGCGCTGACCCACACGCTGCTTTCCACCGCCGTTAACAAAC	
F	661	:	ATGATGCTGCGGGACCGCTGGAGCCTGGTGGCCGAGCGGGCGGGCAGGCCGGGATCGCC	
CL101	661	:	ATGATGCTGCGGGACCGCTGGAGCCTGGTGGCCGAGCGGGCGGGCAGGCCGGGATCGCC	
KOS	661	:	ATGATGCTGCGGGACCGCTGGAGCCTGGTGGCCGAGCGGGCGGGCAGGCCGGGATCGCC	
F	721	:	GGACACACCTACCTCCAGGCG	
CL101	721	:	GGACACACCTACCTCCAGGCG	
KOS	721	:	GGACACACCTACCTCCAGGCG	

Figure 2. Analysis of nucleotide sequence of protease catalytic domain of HSV-1. Different nucleotide sequence among the three strains of HSV-1 is shown (*).

사하였고 4차 면역 반응 후 생쥐의 심장에서 채혈하였고 이를 Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용하여 확인하였고 이를 분주하여 -70℃에 보관하였다.

7. Protease 활성 측정

Protease의 활성도를 측정하기 위해 R site를 포함하는 oligopeptide (M-2160, Bachem사)를 이용했고, 20% acetic acid에 1 mg/ml이 되도록 녹인 후 분주하여 -20℃에서 보관하였다가 사용했다. 효소의 활성 측정을 위해 기질 보존액 5 µl와 assay buffer (50 mM Tricine, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 1.25 M Na₂SO₄)를 섞은 후 protease 10 µl를 첨가하여 30℃에서 1 시간 동안 반응시키고 10% TFA 50 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고 원심분리하였다 [28]. 샘플을 Intersil ODS 컬럼을 이용하여 High performance liquid chromatography (HPLC) (class-VP series, Shimadzu)상에서 분석하였다. 분석을 위해 두 종류의 이동상을 이용하였다. B 이동상의 농도 25%에서 시작하여 30 분 동안 B 농도가 75%될 때까지 증가하는 농도경사를 이용하여 분석하였고 220 nm에서 검출하였다.

이동상 A: 2.81 g NaClO₄ · H₂O + 2 ml H₃PO₄
in 2000 ml H₂O

B: 2.81 g NaClO₄ · H₂O + 2 ml H₃PO₄
in 800 ml H₂O + 1200 ml ACN

결 과

1. HSV-1 UL26의 클로닝

HSV-1 strain F 유전자에서 protease의 catalytic region을 클로닝하기 위해, 먼저 *Eco* RI과 *Not* I site를 가지도록 PCR을 이용하여 증폭하였다. 증폭되어진 유전자와 pET-28(a)를 *Eco* RI과 *Not* I로 절단하였다. 증폭된 유전자를 pET-28(a)에 삽입하였고 이를 pET28-FPro로 명명하였다 (Figure 1). pET28-FPro를 *E. coli*에서 발현시키기 위해 BL21을 형질전환시켰다. 이를 확인하기 위해 BL21을 배양하여 플라스미드를 분리하여 0.8% agarose gel에서 확인하였다.

2. 염기서열 분석

HSV-1 F protease 염기서열 확인을 위하여 pET28-FPro 플라스미드 DNA의 염기서열을 dide-

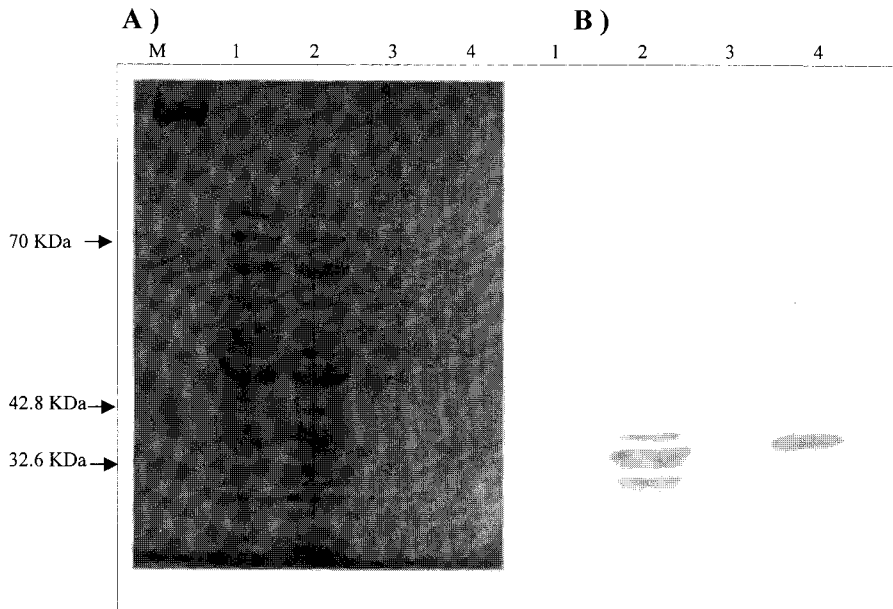


Figure 3. SDS-PAGE and Western blot analysis of HSV-1 protease. **A)** coomassie brilliant blue staining of SDS-PAGE, **B)** the Western blot. Lanes M, molecular weight standards; 1, uninduced crude supernatant from lysed cells; 2, induced crude supernatant from lysed cells; 3, uninduced eluate from His-tagged column; 4, induced eluate from His-tagged column.

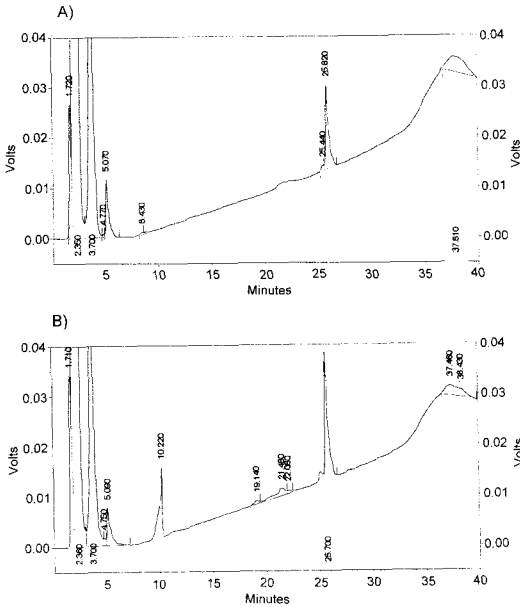


Figure 4. Peptide cleavage assay of the HSV-1 protease. The peptide HTYLQASEKFKMWG-amide was incubated with enzyme for 60 min as described under "Materials and Methods", and cleavage products were analyzed by HPLC. Panel A is the analysis of control sample. The retention time of substrate was 25 min; Panel B is the analysis of the sample in which substrate and enzyme were incubated together. The Products are SEKFKMWG-amide and HTYLQAAA whose the retention time was 19 min and 21 min, respectively.

oxy 방법으로 결정한 다음 strain KOS와 strain CL101과 비교하였다 (Figure 2). 총 741개의 염기서열을 결정하였는데, strain KOS는 5 개의 염기변화가 있었고, strain CL101은 6개의 염기변화가 확인되었다. 하지만 아미노산 서열의 변화는 일어나지 않았다.

3. HSV-1 protease 분리 및 정제

pET28-FPro를 가지고 있는 *E. coli* BL21를 배양하고 0.1 mM IPTG로 유전자 발현을 30°C에서 3시간 유도하였다. 약 32 kDa 정도 되는 histidine-tagged protease fusion protein은 soluble fraction에서 소량, inclusion body에서는 다량 생산함을 확인할 수 있었다. Soluble fraction의 fusion protein을 12.5% SDS-PAGE에서 확인한 것과 항 protease 다항체를 이용하여 Western blot 분석으로 확인한 것을 Figure 3A와 3B에 각각 표시하였다. Soluble

fraction은 His-tagged column을 이용하여 affinity chromatography를 했을 경우, IPTG를 첨가하지 않고 발현을 시켰을 때는 SDS-PAGE와 Western blot에서 protease를 소량밖에 확인할 수가 없었고, 0.1 mM IPTG를 첨가하여 발현시켰을 때는 한 개의 뚜렷한 band의 protease를 확인할 수 있었다. Inclusion body에서는 훨씬 많은 양의 단백질이 생산됨을 확인하였지만 (성적제시 안함), 분리정제의 까다로움 때문에 시도하지 않았다.

4. Protease 활성 분석

HSV-1 protease는 기질의 alanine-serine bond를 특이적으로 절단한다. Protease 활성측정에 이용된 protease 기질 (Bachem사)은 R site의 아미노산 서열과 동일하다: HTYLQASEKFKMWG-amide. 이는 protease에 의해 HTYLQAA와 SEKFKMWG로 두 개의 peptide로 가수분해되어 진다. 분리 정제된 protease의 기질에 대한 활성도를 측정하기 위해 기질과 함께 반응시킨 후 HPLC에서 분석하였다 (Figure 4). 효소를 넣지 않은 반응액에서는 기질의 분해가 일어나지 않았고 기질은 머무름 시간 25 분에서 검출되었다 (Figure 4A). HSV-1 protease의 가수분해에 의해 생성된 peptide는 21 분과 19 분에서 검출되었다 (Figure 4B). 반응액에 1.25 M sodium sulfate를 첨가한 것과 첨가하지 않은 경우 기질의 분해에 있어서 차이가 있었다. Sodium sulfate가 첨가되지 않은 경우 기질분해를 확인할 수 없었지만 (성적제시 안함) 첨가한 경우 기질이 가수분해 되어 짐을 볼 수 있다.

고 찰

HSV-1 strain F에서 protease 활성을 가지고 있는 catalytic region을 PCR법을 이용하여 클로닝을 했다. UL26에서 catalytic domain은 741 개 염기이고 247 개 아미노산으로 구성되어 있다 [22]. KOS와 CL101과 염기서열을 비교한 결과 KOS와는 5 개, CL101과는 6 개의 염기변화가 있었지만 단백질의 3차 구조를 결정하는 아미노산 서열은 변화가 없음을 확인했다. 종들간 비교해 보면 protease homology가 상당히 잘 보존되어 있음이 잘 알려져 있다. Protease의 분리 정제를 위해서 His-Tagged 체계를 이용할 수 있는 pET-28을 사용하였다. 0.1 mM IPTG induction을 통해 soluble fraction을 얻어서 His-Tagged affinity chromatography system을 이

용하여 한번 정제과정으로 하나의 밴드로 분리할 수 있었다. 이는 SDS-PAGE와 Western blot을 통해 확인할 수 있었다. Inclusion body에서는 훨씬 많은 양의 단백질을 분리할 수 있었지만 분리 정제과정중에 불활성화된 효소의 재활성화 과정이 복잡하기 때문에 이용하지 않았다. 일반적으로 IPTG가 첨가되지 않은 경우도 배양액에서 protease 유전자가 조금씩 발현됨을 확인할 수 있었다 (성적제시 안함). 한 단계로 분리 정제된 단백질이 활성을 지님을 확인할 수 있었는데, 효소 활성 측정을 위한 기질은 R site와 동일한 아미노산 서열을 가지고 있는 oligopeptide를 구매하여 사용하였다. 기질의 아미노산 서열은 HTYLQASEKFK-MWG-amide로서 protease에 의해 serine과 alanine이 절단되어 2개의 펩타이드로 가수분해된다. 기질의 가수분해정도를 분석하기 위해 HPLC를 이용하였다. 가수분해되지 않은 기질은 25 분에서 검출하였고 가수분해된 두 펩타이드는 각각 19 분과 21 분에서 검출되었다. 다시 말해 HTYLQA는 19 분에서 검출되었고, SEKFKMWG는 21 분에서 검출되었다. 펩타이드 분자량에 의해 분리가 이루어지므로 먼저 분리되어진 것이 6 개 아미노산으로 이루어진 산물이고 나중에 분리되어진 것은 8 개 아미노산이다. 하지만 기질의 가수분해가 되는 양이 적어서 HPLC분석시 검출하기가 어렵다. 가수분해되는 산물의 양을 증가시키기 위해 sodium sulfate를 첨가하였지만 첨가하지 않은 경우보다 가수분해 되는 양이 조금 증가되었기 때문에 뚜렷한 활성을 측정하기에는 어려웠다. 효소 활성이 높지 않은 것으로 알려진 HSV-1 protease에 대한 저해제 탐색을 위해서는 좀 더 뚜렷한 활성을 검색할 수 있는 조건을 확립하여야겠다. 클로닝된 유전자가 활성을 지닌 효소를 생산한다는 것이 본 연구에서 확인되었기에 현재 분리 정제된 fusion 단백질에서 이질 단백질부분 제거와 또 다른 발현 벡터인 pGX 플라스미드에 삽입되어 발현된 protease의 활성 측정 및 반응조건의 다변화를 시도하고 있다. 이 과정이 성공적으로 끝날 경우 시간과 비용이 많이 소요되는 HPLC 분석법보다 간편하고 대량으로 검색할 수 있는 방법에 이용될 수 있는 기질을 발견하는 것이 앞으로의 목표이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 차세대정밀화학기술 개발사업의 일환으로 1998년도 용역사업인 CH

1-3-06 연구과제의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Blyth WA, Harbour DA, Hill TJ: Effect of acyclovir on recurrence of Herpes simplex skin lesions in mice. *J Gen Virol* **48**: 417-419, 1980.
- 2) Cook ML, Stevens JG: Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence of intra-axonal transport of infection. *Infect Immun* **7**: 272-288, 1973.
- 3) Darke PL, Chen E, Hall DL, Sardana MK, Veloski CA, LaFemina RL, Shafer JA, Kuo LC: Purification of active Herpes simplex virus-1 protease expressed in *E. coli*. *J Biol Chem* **269**: 18708-18711, 1994.
- 4) Davison MD, Rixon FJ, Davison AJ: Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **73**: 2709-2713, 1992.
- 5) Dilanni CL, Drier DA, Deckman IC, McCann PJIII, Liu F, Roizman B, Colonno RJ, Cordingley MC: Identification of the herpes simplex virus 1 protease cleavage sites. *J Biol Chem* **268**: 2048-2051, 1993.
- 6) Elion GB: The chemotherapeutic exploitation of virus specified enzymes. *Adv Enzyme Regul* **18**: 53-66, 1980.
- 7) Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB: Thymidine Kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxy-methyl)guanine. *J Biol Chem* **253**: 8721-8727, 1978.
- 8) Gao M, Matusick-Kumar L, Hurlburt W, Feuerditusa S, Newcomb WW, Brown JC, McCann PJIII, Dechmann IC, Colonno RJ: The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J Virol* **68**: 3702-3717, 1994.
- 9) King J, Casjens S: Catalytic head assembling protein in virus morphogenesis. *Nature (London)* **251**: 112-119, 1974.
- 10) Kristensson K, Lycke E, Roytta M, Svennerholm B, Vahlne A: Neuritic transport of herpes

- simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow. *J Gen Virol* **67**: 2023-2028, 1986.
- 11) Larsson A, Oberg B, Alenius S, Hagberg CE, Johansson NG, Lindborg B, Stening G: 9-(3, 4-dihydroxybutyl)guanine, a new inhibitor of herpesvirus multiplication. *Antimicrob Agents Chemother* **23**: 819-822, 1983.
 - 12) Liu F, Roizman B: Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J Virol* **67**: 1300-1309, 1993.
 - 13) Liu F, Roizman B: Differentiation of multiple domains in the herpes simplex virus 1 protease encoded by the UL26 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2076-2080, 1992.
 - 14) Liu F, Roizman B: The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate. *J Virol* **65**: 5149-5156, 1991.
 - 15) Liu F, Roizman B: The promoter transcriptional unit and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame. *J Virol* **65**: 206-212, 1991.
 - 16) Matusick-Kumar L, McCann PJIII, Robertson BJ, Nercomb WW, Brown JC, Gao M: Release of the catalytic domain No from the herpes simplex virus type 1 protease is required for viral growth. *J Virol* **69**: 7113-7121, 1995.
 - 17) McGeoch DJ, Dalrymple MS, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor E: The complete DNA-sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **69**: 1561-1574, 1988.
 - 18) Person S, Laquerre S, Desai P, Hempel J: The herpes simplex virus type 1 capsid protein, VP21, originates within the UL26 open reading frame. *J Gen Virol* **63**: 3777-3783, 1993.
 - 19) Preston VG, Coates JA, Rixon FJ: Identification and characterization of a herpes simplex gene product required for encapsidation of the viral DNA. *J Virol* **45**: 1056-1064, 1983.
 - 20) Preston VG, Rixon FJ, McDougall IM, McGregor M, Al-Kobaisi MF: Processing of the herpes simplex virus assembly protein ICP35 near its carboxy terminal end requires the product of the whole of the UL26 reading frame. *Virology* **186**: 87-98, 1992.
 - 21) Rixon FJ, Cross AM, Addison C, Preston VG: The products of herpes simplex virus type 1 gene UL26 which are involved in DNA packaging are strongly associated with empty but not with full capsids. *J Gen Virol* **69**: 2879-2891, 1988.
 - 22) Robertson BJ, McCann PJIII, Matusick-kumar L, Preston VG, Gao M: Na, an auto-proteolytic product of the herpes simplex virus type 1 protease, can functionally substitute for the assembly protein ICP35. *J Virol* **71**: 1683-1687, 1997.
 - 23) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467, 1977.
 - 24) Sawtell NM, Thompson RL: Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol* **66**: 2150-2156, 1992.
 - 25) Sherman G, Bachenheimer: Characterization of intranuclear capsids made by is morphogenic mutants of HSV-1. *Virology* **173**: 471-480, 1988.
 - 26) Weinheimer SP, McCann PMIII, O'Boyle DRII, Stevens JT, Boyd BA, Drier DA, Yamanaka GA, Dilanni CL, Deckman IC, Cordingley MG: Autoproteolysis of herpes simplex virus type 1 protease releases an active catalytic domain found in intermediate capsid particles. *J Virol* **67**: 5813-5822, 1993.
 - 27) Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W: A herpesvirus maturational proteinase, assemblin, identification of its gene, putative active site domain and cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10792-10796, 1991.
 - 28) Yamanaka G, Dilanni CL, O'Boyle DRII, Stevens J, Weinheimer SP, Deckman IC, Matusick-Kumar L, Colonna RJ: Stimulation of the herpes simplex virus type 1 protease by antichaeotropic salts. *J Biol Chem* **270**: 30168-30172, 1995.