

## *Paralichthys olivaceus* 추출물에 의한 DNA 복제 개시 단계에서의 억제 효과

이지현 · 임영해 · 이수복 · 김동규<sup>1</sup> · 김동선<sup>2</sup> · 박남규<sup>3</sup> · 정준기<sup>4</sup> · 김남득\*

부산대학교 약학과, <sup>1</sup>인제대학교 화학과, <sup>2</sup>경북대학교 의과대학 해부학교실  
<sup>3</sup>부경대학교 생물공학과, <sup>4</sup>부경대학교 수산생명의학과

### Inhibitory Effects of Extracts of *Paralichthys olivaceus* on DNA replication at the Level of Initiation

Ji Hyeon Lee, Young Hae Lim, Su-Bog Yee, Dong-Kyoo Kim<sup>1</sup>, Dong Sun Kim<sup>2</sup>,  
Nam Gyu Park<sup>3</sup>, Joon-Ki Chung<sup>4</sup> and Nam Deuk Kim

Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735,

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Inje University, Kimhae 621-170,

<sup>2</sup>Department of Anatomy, School of Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701,

<sup>3</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, <sup>4</sup>Department of Aquatic Life Medicine,  
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

#### Abstract

The effects of the RM 60 series on DNA replication system were examined by using simian virus 40 (SV40) DNA replication system in vitro. The RM 60 series inhibited the DNA replication in the initiation step rather than in the elongation step. Polymerase  $\alpha$ -primase activity and topoisomerase I activity study were performed subsequently, the RM 60 series increased the polymerase  $\alpha$ -primase activity in a low dose, but decreased the activity in a higher dose. The topoisomerase I activity was inhibited by the RM 60 series. This result suggests that the RM 60 series might inhibit some molecules which are required to establish replication forks during the initiation step of the DNA replication.

**Key words** – *Paralichthys olivaceus*, replication, SV 40 replication system, polymerase  $\alpha$ -primase activity

#### 서 론

유핵세포에서의 DNA 복제는 세포주기의 S기 동안 염색체 DNA를 따라 분포되어 있는 replicon에서 개시된다 [1-4]. Replicon은 각각의 개시 부위(origin)로부터 양 방향

으로 복제가 시작되어 나간다. 각 복제 개시부의 활성화는 단지 한번만 일어나며 그로 인해 각 세포주기 동안 염색체 DNA 의 각 부분이 정확하게 복제된다[5-7]. 모든 세포는 세포주기의 G1에서 S기 전이과정 중에 성장과 분열을 조절한다. 세포주기 조절과 DNA 복제 수행의 기전을 밝히는 것은 여러 질환, 특히 암에 있어서의 원인을 해명하는 데 있어 매우 중요하다[8,9]. DNA 복제의 개시는 세포주기 조절의 중요한 과정중 하나이다. DNA 복제 개시의 시기는

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : (051) 510-2801, Fax : (051) 513-6754  
E-mail : nadkim@hyowon.pusan.ac.kr

아주 정확히 조절되며 외부 환경 및 세포 내 인자 양자에 모두 민감하다[10-12]. DNA 복제가 억제체에 의해 저해되거나 방사선 및 다른 인자에 의해 복제 주형에 손상이 가해지면 세포주기 진행을 늦추는 신호를 생성하게 된다.

세포 유전체의 복잡성 때문에 염색체 복제 조절을 위한 직접적인 생화학적 연구는 매우 어렵다. 그러나 *in vitro* simian virus 40(SV40) DNA 복제계는 진핵세포의 DNA 복제를 이해하기 위한 한 모델로서 광범위하게 사용되고 있다[13-15]. SV40 T-Ag은 다양한 기능을 가진 단백질로 복제 개시부에서 특정 DNA 부위에 결합하여 복제를 개시한다[16]. 그 외의 다른 기능들은 HeLa 세포질 추출물에 의해 제공된다. 복제 기간 동안 replication protein A(RPA)는 SV40 T-Ag과 topoisomerase 존재 시 SV40 origin을 함유한 DNA의 이중 나선의 풀림을 매개한다. RPA는 T-Ag, DNA polymerase  $\alpha$ -primase 복합체(pol  $\alpha$ -primase)와 상호 작용을 하는데[17,18], 이는 SV40 DNA 복제의 개시에 있어서 필수적인 부분이다[18-20]. DNA pol  $\alpha$ -primase 복합체 또한 진핵세포의 DNA 복제계 필수적인 효소인데, 이는 개시 복합체에서 중요 부분을 차지하며 leading과 lagging strand 합성에 중추적인 역할을 담당한다. DNA polymerase는 *de novo* 상태에서는 DNA 합성을 시작할 수 없으므로 진핵세포의 유전체 DNA 복제개시 동안 primase가 RNA primer라고 하는 oligoribonucleotides를 합성한다[21-23]. 진핵세포에서는 2개의 topoisomerase가 알려져 있는데 DNA topoisomerase는 일시적으로 DNA 가닥을 절단해 DNA 가닥의 연결을 풀고 이 절단 부위를 통해서 DNA의 회전 및 횡단을 가능하게 한다[24,25].

해양생물로부터 항암제 개발의 대표적인 연구를 위해 해면류(porifera), 멍게류(tunicates), 경골어류(osteichthyes) 및 빛해파리류(ctenophora) 등을 시료로 많이 활용하고 있다. 이들로부터 유래된 항암 물질 중 *in vivo*에서도 유의성 있는 활성을 나타내는 물질로서는 didemnin B[26], bryostatin [27,28], halichondrin B[29], dolastatin[30] 등을 들 수 있으며 그 외에도 mycalamide A[31], eroplysinin-1[32], stypoldione[33] 등이 있다. 이러한 물질들은 암 발생의 initiation, promotion, 그리고 progression 단계에서 세포 내 대사의 조절, DNA 반응성 물질들의 차단, DNA 복제나 DNA 수복 조절 또는 microtubule assembly 차단 등의 기전으로 억제작용을 나타낸다고 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라에서 대량 생산되고는 있으나 대부분 식품으로만 사용되고 있는 넙치의 폐기물로부터 추출한 활성물질들이 *in vitro* SV40 DNA 복제계를 이용하여 DNA 복제에 미치는 영향과 작용 억제 기전을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*, 70마리, 체장 25~30cm)는 부산 인근 양어장에서 구입하였다. 살아있는 상태의 넙치로부터 내장을 제외한 육질을 액체질소로 급속 동결시켜 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 추출 및 부분정제 과정

추출 및 부분정제 과정은 이전에 기술된 방법[34]을 약간 변형하여 시행하였다. 동결 보관된 넙치 육질(8kg)을 100°C 증류수로 10~15분간 가열하고 냉각시킨 후, 5% 초산을 넣고 4°C에서 3시간 동안 교반하였다. 교반된 시료는 분쇄기(PT3100, Polytron Co., U.S.A)를 사용하여 10분 동안 10,000 rpm으로 분쇄하고, 분쇄된 시료는 30분 동안 4°C에서 8,000rpm으로 원심분리를 하였다(Supra 21K, Hanil Co., Korea). 상층액을 40°C에서 진공 농축시킨 다음, ethanol을 첨가하여 하루 동안 4°C에서 보관하였다. 그리고 불순물을 제거하기 위해 4°C에서 10,000rpm으로 30분 동안 원심분리를 시행한 후, 상층액에 NaCl을 시료 부피 당 12g의 비율로 첨가하여 4°C에서 하루동안 보관하였다. 시료를 다시 4°C에서 12,000rpm으로 30분 동안 원심분리한 후, 상층액에 최종 농도가 0.1N HCl이 되도록 HCl을 첨가하여, 50분 동안 15,000rpm으로 다시 원심분리하여 상층액을 얻었다. 물질을 분자 크기별로 분리하기 위하여 미리 100% methanol로 활성화시키고 증류수로 충분히 세정한 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge (Supelco Co., U.S.A. 20ml)에 얻어진 상층액을 주입하여 0%(D.W), 10% methanol (RM10), 60% methanol (RM60) 및 100% methanol (RM100)로 물질들을 각각 용출시켜 동결건조를 하고, 무게를 측정하여 -20°C에 보관하였다. 이 중에서 RM60 (1.2g) 분획물은 부분정제를 수행하기 위해 5% 초산에 녹여서 동일 용매로 평형화된 Sephadex G-25 (2.6×110cm) column에 주입하고, 흡광도 254nm에서

90ml/h 속도로 fraction당 15ml씩 분취하였다. 분취된 fraction 중 유용활성이 있는 fraction 164~202을 두 개의 group으로 묶어 각각 RM60(fr.164-178)과 RM60(fr.179-202)로 명명하여 동결건조 후, -20℃에 보관하였다. 본 실험에 사용한 시료는 RM10(1mg/ml), RM60, RM60fr. 164-178, RM60fr. 179-202, RM100, 증류수 용출액(DW) 등이며 0.1% DMSO를 vehicle로 사용하였다.

#### 단백질, 세포추출액 및 DNA 시료

SV40 origin을 함유한 circular duplex DNA (pUC-ori<sup>+</sup>), SV40 T-Ag, topo I, human DNA pol  $\alpha$ -primase, RPA 및 HeLa 추출액은 이전에 기술된 방법으로 준비하였다[35].

#### *In vitro* SV40 DNA 복제

*In vitro* SV40 DNA 복제계를 이전에 기술된 방법으로 시행하였다[36]. 반응혼합물 40 $\mu$ l에는 40mM creatine phosphate/di-Tris salt (pH 7.7), 1 $\mu$ g creatine kinase, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTT, 4mM ATP, 200 $\mu$ M UTP, GOT, 그리고 CTP, 100 $\mu$ M dATP, dGTP, 그리고 dCTP, 25 $\mu$ M [<sup>3</sup>H]dTTP (specific activity 300cpm/pmol), 0.8 $\mu$ g SV40 Tag, 0.3 $\mu$ g SV40 origin-containing DNA, 그리고 적당량의 HeLa extract를 포함한다. 반응혼합물을 37℃에서 120분간 반응시키고 20mM EDTA, 1% SDS, 그리고 *E. coli*-tRNA (0.5mg/ml)로 구성된 용액 80 $\mu$ l로 반응을 중지시켰다. 반응이 중지된 혼합물의 acid-insoluble radioactivity를 측정하였다.

#### DNA Pol $\alpha$ 활성 측정

DNA pol  $\alpha$  활성을 이전에 기술된 방법으로 시행하였다[37]. 반응혼합물 30 $\mu$ l에는 40mM creatine phosphate/di-Tris salt (pH 7.7), 1.0 $\mu$ g creatine kinase, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0mM DTT, 6 $\mu$ g BSA, 4mM ATP, 33 $\mu$ M [<sup>3</sup>H]dTTP (500cpm/pmol), 0.1 $\mu$ g (dA)4500 : oligo(dT)25, 그리고 DNA polymerase를 포함한다. 혼합물을 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 acid-soluble radioactivity를 측정하였다.

#### Topoisomerase I relaxation 측정

Topoisomerase I 효소는 현재 항암 약물 개발에 있어서 아주 흥미롭고 새로운 대상으로 DNA의 복제나 수복

시 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 이 topoisomerase I 효소의 활성의 저해는 항암물질로서의 가능성을 제시해 줄 수 있는 하나의 지표가 될 수 있다.

Topoisomerase는 superhelical plasmid DNA의 relaxation에 의해 측정하였다[25]. 반응액 (50mM Tris, pH 7.5, 120mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 0.5mM EDTA, 30 $\mu$ g/ml bovine serum albumin, 20 $\mu$ g/ml pSA)에 0.1 $\mu$ g의 pBR322 plasmid DNA와 topoisomerase I, 각 시료[RM10 (1 mg/ml), RM60, RM60fr. 164-178, RM60fr. 179-202, RM100, DW, 0.1% DMSO (vehicle)]를 농도별로 혼합한 후 30℃에서 30분간 incubation하였다. 반응 후 50% glycerol / 5% SDS / 1mg/ml BPB를 넣어 반응을 종결시킨 후 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시했다. DNA를 ethidium bromide로 염색해서 UV transilluminator에서 관찰하여 topoisomerase I에 의한 DNA relaxation에 미치는 시료들의 영향을 살펴보았다.

## 결 과

RM 시리즈에 의한 SV40 DNA 복제 및 신장 억제 연구 DNA 복제에 대한 RM 시리즈 물질인 RM60, RM60 (fr.164-178), RM60 (fr.179-202)의 영향을 SV40 DNA 복제계를 이용하여 조사하였다. RM 시리즈 물질의 양을 증가시키면서 HeLa 세포질 추출물을 이용한 SV40 DNA 복제의 억제 유무를 조사한 결과 RM60 (fr. 164-178)과 RM60 (fr. 179-202)에 비해 RM60의 경우 아주 강하게 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 1).

Replication 억제 작용 기전을 연구하기 위해 개시(Initiation)와 신장(elongation) 단계에 대한 억제 유무를 조사하였다. 실제 DNA-단백질 복합체 형성은 SV40 DNA의 개시를 위한 필수적인 단계이다. 이 복합체는 37℃에서 dNTPs 없이 형성되며 replication origin, SV40 T-Ag, ATP, host proteins 등에 의존한다. 만약 dNTPs가 존재할 경우 당연히 DNA의 합성이 일어나게 된다.

이러한 복제 활성은 ATP 존재 하에 preincubation 전에 RM60과 RM60 (fr. 164-178) 물질을 첨가할 경우 강하게 억제되었다(Fig. 2A). Preincubation 후에 RM60과 RM60(fr. 164-178) 물질을 첨가할 경우 약하게 억제되었다(Fig. 2B).

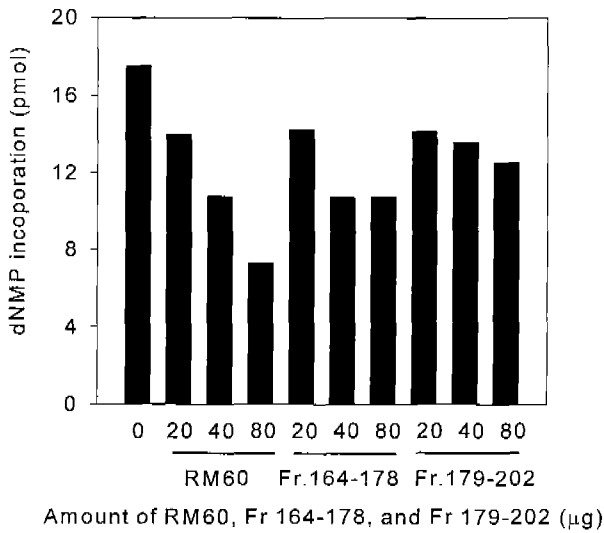


Fig. 1. The effect of RM60 series on SV40 DNA replication *in vitro*.

Replication reaction comprised SV40 origin-containing DNA (pUC-ori<sup>+</sup>), SV40 T-Ag, HeLa cytosolic extract (100 µg), [<sup>3</sup>H]dTTP, and the indicated amounts of RM60 series. Reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 h, and the reaction products examined for acid-insoluble radioactivity.

RM 시리즈에 의한 pol α-primase 활성 억제 연구  
RM60, RM60 (fr. 164-178), RM60 (fr. 179-202) 물질들

대상으로 pol α-primase의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 RM 60 시리즈 물질이 첨가되지 않은 '0'에서 dTMP 혼입이 약 14 pmol이었다. 그러나 20µg 정도 낮은 농도로 첨가하였을 경우 dTMP 혼입을 증가시켰다(Fig. 3). 즉 이러한 결과는 pol α-primase의 활성을 증가시켰다는 것을 의미한다. 그러나 60µg의 농도에서는 억제되는 경향으로 보아 bi-phase 양상을 보이는 것으로 사료된다. 본 실험은 3회에 걸쳐 반복하였으나 동일한 결과를 보였기 때문에 이에 대한 자세한 연구가 필요하다고 사료된다.

RM 시리즈에 의한 topoisomerase I 활성 억제 연구  
세포 독성 실험에 사용하였던 시료들에 대하여 topoisomerase I 효소의 활성화에 대한 효과를 검색한 결과, 세포 독성 실험 결과와 유사하게 시료들 중 RM60과 이들의 분획물들에서 topoisomerase I의 작용을 저해하는 활성이 관찰되었으며, RM60의 분획물들 중 fr. 179-202의 경우가 fr. 164-178의 경우보다 약간 더 강한 활성이 나타났다(Fig. 4).

## 고찰

본 연구에서는 넘치의 미이용 폐기물을 이용하여 유방암 세포주에 대한 세포독성 효과와 *in vitro* SV40 DNA 복

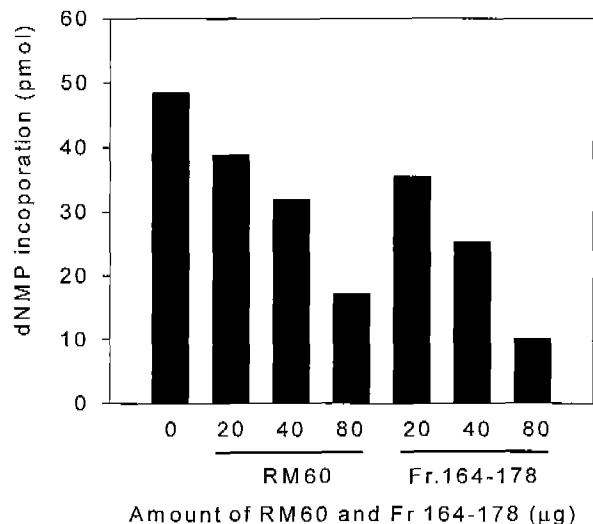
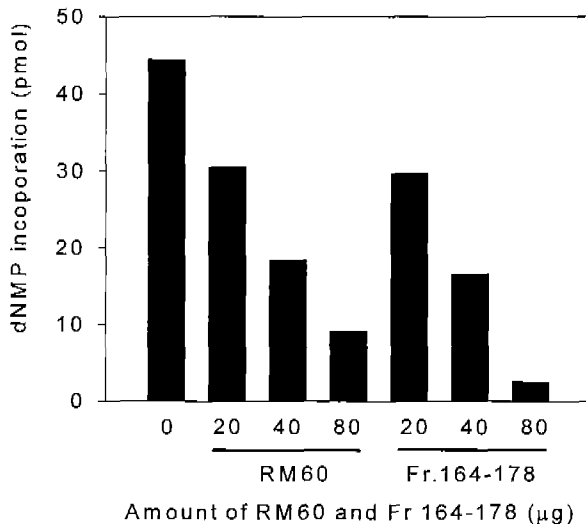


Fig. 2. RM60 and Fr.164-178 inhibited the initiation state of SV40 DNA replication *in vitro*.

The RM60 and Fr.164-178 were added to reaction mixture before (A) or after (B) the preincubation in the presence of ATP at 37°C for 30 min. [<sup>3</sup>H]dNTPs were then added, and mixtures were incubated at 37°C for 2 h, and the reaction products examined for acid-insoluble radioactivity. All other conditions were the same as those described in the legend for Fig. 1.

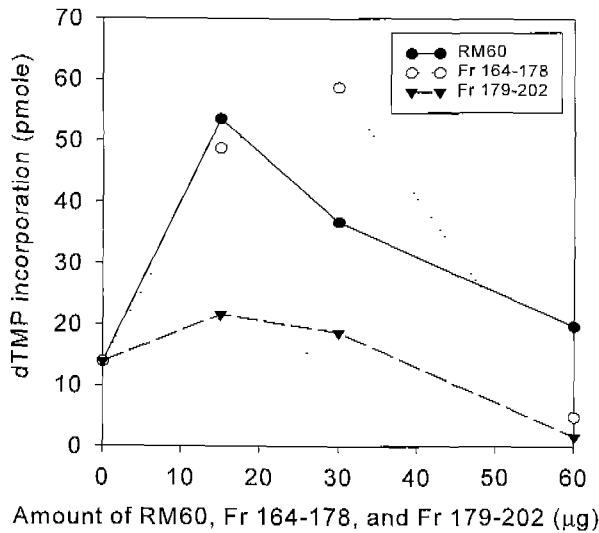


Fig. 3. The effect of RM60 and Fr.164-178 on pol  $\alpha$ -primase activity.

Indicated amounts of RM60 and Fr.164-178 were added to the reaction mixtures, which included 0.1 unit of human pol  $\alpha$ -primase complex, 4 mM ATP, 1 mM [ $^3$ H] dTTP, and 0.1  $\mu$ g of poly(dA)<sub>4500</sub>:oligo(dT)<sub>12-15</sub>. Incubation ran at 37°C for 30 min, followed by measurement of acid-insoluble radioactivity.

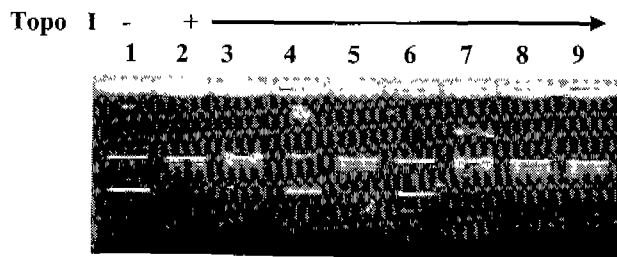


Fig. 4. Inhibition of topoisomerase I catalytic activity by RM series.

Topoisomerase activity was measured by the relaxation of superhelical plasmid DNA. The assay mixture (20  $\mu$ l) contained pSA (20  $\mu$ g/ml), topo I, and RM series. After 30 min at 30°C, the reactions were stopped by the addition of 5  $\mu$ l of stop solution. The samples were then loaded onto the agarose gel (0.8%) for electrophoresis followed by photography. 1. pBR 322; 2. Topo I; 3. RM10 (1 mg/ml); 4. RM60; 5. RM60fr. 164-178; 6. RM60fr. 179-202; 7. RM100; 8. DW; 9. 0.1% DMSO (vehicle).

제계를 이용하여 DNA 복제 억제 활성 유무를 시험하였다. 넓치 미이용 폐기물의 가수분해 산물 중 RM60, RM60(fr. 164-178), RM60(fr. 179-202)의 DNA 복제계에 대한 영향은 *in vitro* SV40 DNA 복제계를 이용하여 조사하였다. 바이러

스에 의해 기호화된 T-Ag 이외의 SV40 DNA 복제는 전적으로 숙주세포의 효소계에 의존한다. 본 연구에서는 RM60, RM60 (fr. 164-178)은 *in vitro* SV40 DNA 복제를 강하게 억제하였고 특히 DNA 복제의 개시 단계를 현저히 억제하였다.

SV40 DNA 복제에서 SV40 T-Ag, RPA, pol  $\alpha$ -primase 복합체는 DNA 복제 개시에 있어서 필수적이다. Topoisomerase 존재 하에서 T-Ag은 DNA 가닥을 풀어서 풀린 DNA를 형성한다[38]. 이 세가지 요소와 topoisomerase에 의한 DNA 합성은 광범위하게 일어날 수 있다[39]. 본 연구에서는 RM60 분획이 DNA 복제의 개시 동안 복제가지를 형성하는 데 필수적인 몇몇 단백질을 억제하리라는 가정을 할 수 있었다. 이러한 가정을 시험하기 위해 RM60의 분획물들의 topoisomerase I과 DNA pol  $\alpha$ -primase 복합체에 대한 영향을 조사하였다. Topoisomerase inhibitor는 현재 중요한 항암제로 사용되고 있는데 camptothecin 및 그 유도체가 topoisomerase I을 목적으로 한 항암제로 알려져 있다[24]. RM60, RM60(fr. 178-202)에서 topoisomerase I에 의한 DNA 절단이 억제되었으며 RM 60(fr. 164-178)에서는 거의 관찰되지 않았다. DNA pol  $\alpha$ -primase activity 연구에서는 RM60, RM60(fr. 164-178), RM60(fr. 179-202)는 저농도에서는 DNA pol  $\alpha$ -primase activity를 증가시켰으나 고농도에서는 활성을 억제하였다. RM60 시리즈 물질이 첨가되지 않은 '0'에서 dTMP 혼입이 약 14pmol이었다. 그러나 20 $\mu$ g 정도 낮은 농도로 첨가하였을 경우 dTMP 혼입을 증가시켰다(Fig. 3). 즉 이러한 결과는 pol  $\alpha$ -primase의 활성을 증가시켰다는 것을 의미한다. 그러나 60 $\mu$ g의 농도에서는 억제되는 경향으로 보아 bi-phase 양상을 보이는 것으로 사료된다. 본 실험은 2회에 걸쳐 반복하였으나 동일한 결과를 보였기 때문에 이에 대한 자세한 연구가 필요하다고 사료된다. 앞의 결과에서 볼 수 있듯이(Fig. 2A 대 Fig. 2B) RM60 및 RM60 (fr. 164-178)은 ATP와 DNA 존재 하에서 preincubation 전에 반응물에 첨가하였을 경우, preincubation 이후에 첨가되었을 때보다 훨씬 강력하게 억제한다는 것을 알 수 있다. RM60 (fr. 179-202)는 topoisomerase I의 활성을 RM60 (fr. 164-178)에 비해 더욱 강력히 억제한다는 것을 알 수 있었으며 또한 DNA pol  $\alpha$ -primase 활성 억제 시험에서도 RM60 및 RM60 (fr. 164-178)에 비해 억제 작용이 높게 나타났다. 그

러나 RM60 (fr. 179-202)는 SV40 DNA 복제계에서 RM60 (fr. 164-178)에 비해 DNA 복제 억제 작용이 낮게 나타났으며 이는 이들 RM 시리즈들이 특정한 한 효소를 억제한다기보다 DNA 복제가지에 필수적인 효소 중 몇 가지 분자를 억제한다는 것을 의미한다. 그러므로, RM 시리즈들은 DNA-단백질 복합체를 우선적으로 억제하는 것으로 생각된다.

## 요 약

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 폐기물에서 추출한 RM 60 series (RM10, RM60, RM100) 등이 Simian virus 40 (SV40) DNA 복제계에 미치는 영향을 조사하였다. 시료 중 RM60 추출물들이 DNA 복제 반응 중 초기 단계의 반응을 억제하였다. 그리고 polymerase  $\alpha$ -primase 및 topoisomeras I의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 RM60의 경우 낮은 농도에서 polymerase  $\alpha$ -primase의 활성을 증가시켰으나 높은 농도에서는 오히려 polymerase  $\alpha$ -primase의 활성을 감소시켰다. 그리고 RM60은 topoisomeras I의 활성화도 억제하였다. RM60의 추출물을 세분화한 Fr.164-178 분획과 Fr.179-202 분획의 경우 분리한 실험에서는 Fr.179-202가 Fr.164-178 분획 보다 높은 topoisomeras I 활성화 억제 효과가 있었다. 이러한 결과는 RM60 추출물이 DNA 복제계의 초기 단계에 필요로 하는 복제가지계 단백질의 작용을 억제하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(1997-023-H00043)의 지원에 의한 것입니다.

## 참 고 문 헌

1. Brush, G. S., C. W. Anderson and T. J. Kelly. 1994. The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during Simian virus 40 DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12520-12524.
2. Taylor J. H. 1984. Origins of replication and gene regulation. *Mol. Cell. Biochem.* **61**, 99-109.

3. Kim, D. K., J. R. Lee, A. Kim, S. Lee, M. A. Yoo, K. W. Kim, N. D. Kim and H. Suh. 1999. Inhibition of initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro by the ursodeoxycholic acid and its derivatives. *Cancer Letters* **146**, 147-153.
4. Kim, D. K., J. H. Baek, C. M. Kang, M. A. Yoo, J. W. Sung, D. K. Kim, H. Y. Chung, N. D. Kim, Y. H. Choi, S. H. Lee and K. W. Kim. 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int. J. Cancer* **87**, 629-636.
5. Blow, J. J. and R. A. Laskey. 1988. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* **332**, 546-548.
6. Blow, J. J. 1993. Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *J. Cell. Biol.* **122**, 993-1002.
7. Coverley, D., C. S. Downes, P. Romanowski, and R. A. Laskey. 1993. Reversible effects of nuclear membrane permeabilization on DNA replication: evidence for a positive licensing factor. *J. Cell. Biol.* **122**, 985-992.
8. Balmain, A., A. Alonso and J. Fischer. 1977. Histone phosphorylation and synthesis of DNA and RNA during phases of proliferation and differentiation induced in mouse epidermis by the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **37**, 1548-1555.
9. Dictor, M., M. Ehinger, F. Mertens, J. Akervall and J. Wennerberg. 1999. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am. J. Clin. Pathol.* **112**, S40-52.
10. Michaelson, J. S., O. Ermakova, B. K. Birshtein, N. Ashouian, C. Chevillard, R. Riblet and C. L. Schildkraut. 1997. Regulation of the replication of the murine immunoglobulin heavy chain gene locus: evaluation of the role of the 3' regulatory region. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6167-6174.
11. Saka, Y., F. Esashi, T. Matsusaka, S. Mochida and M. Yanagida. 1997. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif with Cut5 and Chk1. *Genes Dev.* **11**, 3387-3400.
12. Amiel, A., T. Litmanovitch, M. Lishner, A. Mor, E. Gaber, I. Tangi, M. Fejgin and L. Avivi. 1998. Temporal differences in replication timing of homologous loci in malignant cells derived from CML and lymphoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* **22**,

- 225231.
13. Li, J. J. and T. Kelly. 1984. Simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6973-6977.
  14. Stillman, B. W. and R. Gluzman. 1985. Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2051-2060.
  15. Wobbe, C. R., F. Dean, L. Weissbach, and J. Hurwitz. 1985. *In vitro* replication of duplex circular DNA containing the simian virus 40 DNA origin site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5710-5714.
  16. Tegtmeyer, P. 1972. Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis. The viral replication. *J. Virol.* **10**, 591-598.
  17. Dornreiter, I., L. F. Erdile, I. U. Gilbert, D. Winkler, T. J. Kelly and E. Fanning. 1992. Interaction of DNA polymerase  $\alpha$ -primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J.* **11**, 769-776.
  18. Lee, S. H. and D. K. Kim. 1995. The role of the 34-kDa subunit of human replication protein A in simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **270**, 12801-12807.
  19. Melendy, T. and B. Stillman. 1993. An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* **268**, 3389-3395.
  20. Collins, K. L. and T. J. Kelly. 1991. Effects of T antigen and replication protein A on the initiation of DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2108-2115.
  21. Schneider, A., R. W. P. Smith, A. R. Kautz, K. Weisshart, F. Grosse and H-P. Nasheuer. 1998. Primase activity of human DNA polymerase  $\alpha$ -primase. *J. Biol. Chem.* **273**, 21608--21615.
  22. Mizuno, T., K. Yamagishi, H. Miyazawa and F. Hanaoka. 1999. Molecular architecture of the mouse DNA polymerase alpha-primase complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7886-7896.
  23. Foiani, M., G. Lucchini and P. Plevani. 1997. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 424-427.
  24. Pommier, Y. F., F. Leteurtre, M. R. Fesen, A. Fujimori, R. Bertrand, E. Solary, G. Kohlhagen and K. W. Kohn. 1994. Cellular Determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest.* **12**, 530-542.
  25. Liu, L. F. and K. G. Miller. 1981. Eukaryotic DNA topoisomerases: Two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3487-3491.
  26. Geldof, A. A., S. C. Mastbergen, R. E. Henrar and G. T. Faircloth. 1999. Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using *in vitro* assays. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**, 312-318.
  27. Thijsen, S. F., G. J. Schuurhuis, J. W. van Oostveen, A. P. Theijssmeijer, K. G. van der Hem, J. H. Odling, A. M. Drager and G. J. Ossenkoppele. 1999. Effects of bryostatin-1 on chronic myeloid leukaemia-derived haematopoietic progenitors. *Br. J. Cancer* **79**, 1406-1412.
  28. Propper, D. J., V. Macaulay, K. J. O'Byrne, J. P. Braybrooke, S. M. Wilner, T. S. Ganesan, D. C. Talbot and A. L. Harris. 1998. A phase II study of bryostatin 1 in metastatic malignant melanoma. *Br. J. Cancer* **78**, 1337-1341.
  29. Munro, M. H., J. W. Blunt, E. J. Dumdei, S. J. Hickford, R. E. Lill, S. Li, C. N. Battershill and A. R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* **70**, 15-25.
  30. Mirsalis, J. C., J. Schindler-Horvat, J. R. Hill, J. E. Tomaszewski, S. J. Donohue and C. A. Tyson. 1999. Toxicity of dolastatin 10 in mice, rats and dogs and its clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44**, 395-402.
  31. Burres, N. S. and J. J. Clement. 1989. Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and -B and onnamide. *Cancer Res.* **49**, 2935-2940.
  32. Koulman, A., P. Proksch, R. Ebel, A. C. Beekman, W. van Uden, A. W. Konings, J. A. Pedersen, N. Pras and H. J. Woerdenbag. 1996. Cytotoxicity and mode of action of aeropylsinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Nat. Prod.* **59**, 591-594.
  33. O'Brien, E. T., R. S. Jacobs and L. Wilson. 1983. Inhibition of bovine brain microtubule assembly *in vitro* by stypoldione. *Mol. Pharmacol.* **24**, 493-499.
  34. Takahashi, T., O. Matsushima, F. Morishita, M. Fujimoto, T. Ikeda, H. Minakata and K. Nomoto. 1994. A myomodulin-CARP-related peptide isolated from a polychaete annelid, *Perinereis vancaurica*. *Zoolog. Sci.* **11**, 33-38.
  35. Lee, S. H., Pan, Z.Q., Kwong, D., Burgers, P.M., and Hurwitz, J. 1991. Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **266**, 22707-

- 22717.
36. Lee, S. H., T. Eki and J. Hurwitz, J. 1989. Synthesis of DNA containing the simian virus 40 origin of replication by the combined action of DNA polymerase  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7361-7365.
37. Kenny, M. K., S. H. Lee and J. Hurwitz. 1989. Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerase  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9757-9761.
38. Wold, M. S. and T. J. Kelly. 1988. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2523-2527.
39. Ishimi, Y., A. Claude, P. Bullock and J. Hurwitz. 1988. Complete enzymatic synthesis of DNA containing the SV40 origin of replication. *J. Biol. Chem.* **263**, 19723-19733.

(Received June 10, 2001; Accepted July 27, 2001)