약학회지 제42권 제 1 호 46~52(1998)
*Yakhak Hoeji* Vol. 42, No. 1

# 맥아당결합 단백질에 융합된 면역결핍 바이러스 인테그라제의 생산 및 분석

김도진 · 오유택 · 신차균#
중앙대학교 산업대학
(Received October 25, 1997)

# Production and Characterization of Human Immunodeficiency Virus Integrase Fused with a Maltose-Binding Protein

Do Jin Kim, You-Take Oh and Cha-Gyun Shin#
*College of Industrial Studies, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea*

**Abstract**—Retroviral integrase is required for integration of viral DNA into the host cell chromosome. Human immunodeficiency virus type-1 integrase was partially purified as a part of a fusion protein linked to a maltose-binding protein and characterized in terms of an endonucleolytic activity. The concentration of the fusion protein purified through an amylose column was about 12 mg/ml, indicating that the solubility of the fusion protein is highly increased by the presence of a maltose-binding protein, considering that the integrase protein alone is poorly solubilized. The endonucleolytic activity of the fusion protein was detected at 0.1 to 1.0 mM $Mn^{++}$ ion, but not at any concentrations tested of $Mg^{++}$ ion.

**Keywords** Fusion protein, integrase, maltose-binding protein, endonucleolytic activity.

인간 면역결핍 바이러스는 인간의 T-임파구에 침투한 후 원형질에서 바이러스의 RNA 유전자를 DNA 유전자로 전환하고, DNA 유전자가 핵으로 들어가서 T-임파구의 유전자를 끊고 그사이에 중합하게된다. 이러한 바이러스 DNA 유전자의 중합은 바이러스의 복제와 생성을 위하여 필요불가결한 과정이며, 이과정을 중개하는 것이 바이러스의 특유의 효소인 integrase이다.[1-4] 바이러스 DNA의 중합과정에서 integrase는 직선형의 바이러스 DNA유전자의 양쪽 3′ 말단부분에서 각기 두 개의 nucleotide을 제거하고, 두 개의 nucleotide가 짧아진 끝을 이미 사다리형태로 절단해놓은 숙주세포의 유전자에 연결시킨다. 연결되지 않은 5′ 말단은 숙주세포의 유전자 복구효소들에 의하여 두 개의 nucleotide가 절단된 후 숙주세포의 유전자에 연결됨으로써, 바이러스 DNA 유전자가 완전히 숙주세포의 유전자에 중합하게 된다.[5] 바이러스 DNA가 숙주세포의 유전자에 중합될 때, 바이러스 DNA가 들어가는 숙주세포 DNA내의 부위는 별다른 특이성이 없다. 그러나, 면역결핍바이러스의 integrase가 바이러스 DNA 끝의 두 개 핵산을 제거하는 활성은 면역결핍바이러스의 DNA에서만 나타난다.[6-8] 면역결핍 바이러스의 integrase의 유전자는 바이러스 유전자 pol의 끝부분에 존재하며, 감염된 세포에서 바이러스의 다른 효소들과 함께 polyprotein의 일부분으로 생성된다. 바이러스 조립과정에서 바이러스의 단백분해효소에 의하여 polyprotein에서 절단되어 바이러스 입자안에 포함된다.[6,7] 박테리아에서 발현시켜 정제한 면역결핍 바이러스의 활성은 바이러스 DNA 끝의 염기서열을 닮은 이중가닥 oligonucleotide의 한쪽 가닥의 5′ 말단을 방사능으로 표

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0334-70-3067 (팩스) 0334-675-0409

식하고 integrase로 처리할 때, 두 개의 핵산이 3′ 말단에서 제거되는 것을 이용한 endonucleolytic cleavage 활성으로 측정한다.[3]

면역결핍 바이러스의 integrase 단백질은 구조 및 기능상에서 N-말단영역, 중앙영역, C-말단영역으로 구분된다.[9,10] N-말단영역에는 각기 두 개의 histidine과 cysteine의 Zn-finger 부분이 존재하나, Zn가 단백질의 효소적 활성이나 구조의 변화에 별다른 영향을 주지 않는다. 그러나, 이영역은 integrase의 dimerization에 관여하고 있으며, 이부분이 제거되면, 효소적 활성을 상실한다.[9] 중앙영역은 효소적 활성이 직접적으로 발현되는 부분으로, 이부분의 염기서열은 유사한 다른 바이러스들의 integrase에서도 거의 일치되고 있다.[10-12] C-말단영역은 DNA에 결합하는 부분으로 소수성을 지니고 있다. 박테리아에서 발현하여 생성한 integrase는 용해성이 매우 낮으며, 용액중에서 불안정하여 쉽게 침전으로 떨어져서 활성을 상실하여 연구에 많은 어려움을 주고 있다. 본연구에서는 용해성이 좋은 맥아당결합단백질에 integrase를 붙인 융합단백질로써 integrase를 생성하고, 이융합단백질이 보이는 integrase의 endonucleolytic 활성을 분석하였다.

## 실험방법

**시약 및 사용기기** – 제한효소 (BamHI, HindIII), T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase (T4 PNK), pMalc2, amylose resin등은 New England Biolabs사에서 구입하였다. DNA Sequencing kit는 United States Biochemicals사에서 구입하고, Isopropylthiogalactopyranoside (IPTG), agarose, ampicillin등은 Sigma사에서 구입하였다. [$\gamma^{32}$-P]-ATP (3,000 Ci/mmol; 1Ci=37 GBq)는 미국Amersham사에서 구입하였고, Sephadex G25 column은 Pharmacia사에서 구입하였다. 사용된 기기로는 세포의 파괴를 위하여 미국 Misonix사의 초음파파쇄기 (Sonicator; XL2020)을 사용하였으며, 박테리아의 배양은 한국 비전과학사의 진탕배양기를 이용하였다. Oligonucleotide는 한국바이오니아에서 합성하였고, 사용하기 직전에 PAGE 정제하였다.

**발현벡터의 제작 및 발현** – 발현벡터를 제작하기위하여 면역결핍바이러스 integrase유전자를 함유하는 pQEIN을 제한효소 BamHI과 HindIII로 처리하고 agarose 전기영동한 후, 0.9 b의 DNA 절편을 glass milk를 사용하여 분리하였다. 벡터 pMalc2를 BamHI과 HindIII로 처리하여 6.7 Kb의 DNA 절편을 분리하고, integrase유전자와 섞고 T4 DNA ligase와 함께 16°C에서 4 시간 처리하고 반응물을 박테리아(*E. coli*, XL1-blue)에 넣어 42°C에서 3 분간 처리하여 형질전환시켰다. Ampicillin 존재하에 성장하는 균주들의 플라스미드를 추출하여 제한효소로 처리하여 integrase유전자를 함유하는 균주를 선정하고, 재조합된 발현벡터에 integrase유전자가 벡터에 in-frame으로 재조합되었음을 DNA 염기서열분석으로 최종 확인하였다. 융합단백질의 발현은 발현벡터를 함유하는 균주를 100 ug/m*l* ampicillin을 함유하는 LB배지에서 흡광도가 595 nm에서 0.6될 때까지 배양한 후, 최종 농도가 0.3 mM이 되도록 IPTG를 넣고 3 시간 더 배양하여 유도하였다. 단백질의 발현 유무는 배양액 1 m*l*을 원심분리하여 얻은 균주체를 전기영동염색액에 넣고 가열한 후, SDS-PAGE 전기영동으로 확인하였다.

**융합단백질의 정제** – Integrase를 함유하는 융합단백질의 대량 정제를 위하여 발현벡터를 함유하는 균주의 500 m*l* 배양액을 위에서와 같은 조건에서 발현을 유도하고, 발현이 확인된 균주의 pellet을 5 ml의 완충용액 A (10 mM sodium phosphate, [pH 7.2], 1 mM β-mercaptoethanol (β-MeOH), 1 mM EDTA, 1 M NaCl)에 현탁한 후, 초음파파쇄기을 이용해서 세포를 파괴하였다. 파괴된 세포시료를 4°C에서 40,000 × g로 20 분간 원심분리을 하여 4.5 m*l* 정도의 상등액을 얻은 다음, 같은 부피의 완충용액 B (10 mM sodium phosphate, [pH 7.2], 1 mM β-MeOH, 1 mM EDTA)로 섞어 희석하였다. 미리 준비한 0.3 m*l*의 amylose resin을 함유하는 컬럼에 희석액을 통과시키고, 5 m*l*의 완충용액 C (10 mM sodium phosphate, [pH 7.2], 1 mM β-MeOH, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.25 % Tween 20)로서 컬럼을 충분히 씻어주었다. 150 u*l*의 완충용액 D(10 mM sodium phosphate, [pH 7.2], 1 mM β-MeOH, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA)을 stepwise형태로 10번 통과하여 융합단백질을 추출하였다. 수집된 각 분획에 존재하는 단백질의 분포는 SDS-PAGE 전기영동으로 확인하고, 융합단백질이 다량으로 있는 부분만을 따로 모아, Biospin30을 통과시켜서 완충용액에 존재하는 maltose와 고농도의 염를 제거하였다. 단백질의 양을 Bradford assay 방법으로 측정하고,

정제된 융합 단백질을 소분하여 -70°C에 보관하였다. 융합단백질의 integrase활성과의 비교를 위하여 사용된 histidine 표식된 integrase는 본실험실에서 이미 발표한 방법에 따라 정제하였다.[13]

**이중가닥 oligonucleotide 기질의 제작** – 융합단백질에 존재하는 integrase의 활성의 측정에 사용될 기질로써, 방사능으로 표식된 이중가닥 oligonucleotide 기질을 다음과같이 제작하였다. 먼저 면역결핍바이러스의 U5-LTR 끝부분과 같은 염기 서열을 갖는 20 mer 크기의 2 개의 oligonucleotide (K16 [U5-LTR, +strand], 5′-TGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3′; K17 [U5-LTR, -strand], 5′-ACTGCTAGAGATTTTCCACA-3′)를 PAGE 정제하였다. 정제된 K16을 방사능으로 표식하기 위하여, 15 pmol K16, 50 uCi [$\gamma^{32}$-P]-ATP 및 1 unit T4 polynuclotide kinase을 40 u*l*의 반응용액 (70 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol)에서 15 분간 37°C에서 반응시키고, 최종농도로 10 mM EDTA, 100 mM NaCl이 되도록 EDTA와 NaCl를 첨가하고, 85°C에서 15분간 가열하였다. 상보적인 염기서열을 갖는 K17 (30 pmol)을 첨가한 후, 3 분간 끓인 다음 천천히 식혀서, 상보적인 결합이 일어나게 하였다. 방사능으로 표식된 기질들과 반응하지 않은 방사능은 Sephadex G25 컬럼를 통과시켜서 분리하였다.

**융합단백질의 integrase활성의 측정** – 융합단백질의 integrase의 활성은 바이러스 LTR끝의 염기서열을 닮은 20 bp의 이중가닥 oligonucleotide중 한쪽가닥의 3′ 말단의 2 개의 nucleotide가 제거되는 endonucleolytic 활성을 측정하여 조사하였다. 방사능으로 표식된 0.1 pmol 이중가닥 oligonucleotide 기질과 30 pmol 융합단백질 (MBP-IN)을 10 u*l* 부피의 기본 반응완충액 (10 mM Tris-HCl [pH 7.4])에 각 실험에서 표시된 성분을 가감하여서 90분간 33*l*에서 반응시켰다. 반응정지용액(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenolblue, 0.05% xylene cyanol FF) 4 u*l*을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응한 생성물의 확인은 반응물을 20 % 변성 acrylamide gel에서 전기영동하고, 젖은 gel을 X-ray 필림에 노출하여 측정하였다.[13]

## 결과 및 고찰

**발현벡터의 제작 및 발현** – 면역결핍바이러스의 integrase 유전자는 바이러스 pol 유전자의 3′ 말단지역에 존재하며, 바이러스 자가복제할 때에 Gag-Pol polyprotein의 C-말단에 일부분으로써 생산되어 바이러스 조립과정에서 단백분해효소에 의하여 절단됨으로써 활성을 갖는다.[6,7] 본연구에서 integrase의 유전자는 이미 본실험실에서 integrase 발현벡터로써 발표한 pQEIN에서 얻었다.[13] 맥아당결합단백질에 융합된 integrase의 발현벡터는 pQEIN을 BamHI 및 HindIII로 처리하여 얻은 0.9 Kb의 DNA 절편을 pMalc 2에 옮겨서 제작하고 재조합된 발현벡터를 pMal-IN으로 명명하고, 최종적으로 DNA 염기서열을 분석하여 integrase 유전자가 맥아당단백질의 끝부분에 정확하게 연결되었음을 확인하였다 (Fig. 1). 이벡터는 integrase유전자가 맥아당결합 단백질의 유전자 (MalE)의 뒤부분에 직접 연결되어 있어 분자량 74,000 Da되는 융합단백질이 IPTG가 처리된 균주에서 생성되게한다. pMal-IN이 융합단백질을 잘 발현하는가를 조사하기 위하여 맥아당결합 단백질의 유전자만을 함유하는 발현벡터 (pMalc2)와 융합단백질의 벡터 (pMal-IN)의 균주들을 각기 IPTG를 첨가한 것과 안한 것의 단백질 생성을 비교하였다 (Fig. 2). IPTG를 첨가하지 않은 배양에서는 맥아당결합 단백질이나, 융합단백질이 거의 생성되지않아 단백질의 발현이 lac repressor에 의하여 잘 억제되고 있으나 (lanes 2 and 4), IPTG를 첨가한 배양에서는 맥아당결합 단백질과 융합단백질이 매우 높은 수준으로 생성되고 있음을 보여준다 (lanes 3 and 5).

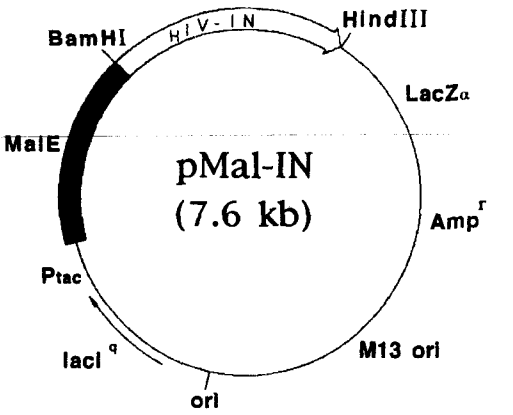


**Fig. 1** — Genetic map of a fusion protein expression vector (pMal-IN) coding a maltose-binding protein and a HIV-1 integrase.

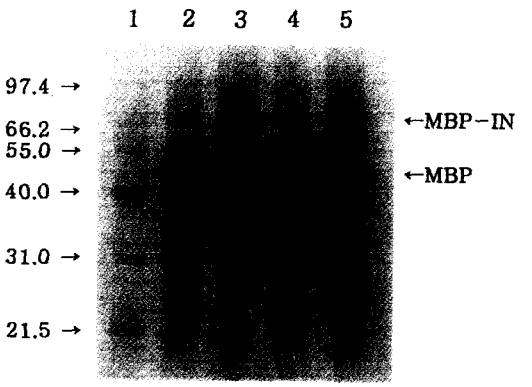


**Fig. 2** — Induction of a MBP-IN fusion protein in the bacterial cultures. Bacterial strains were grown at 37°C in LB media containing ampicillin until absorbances at 595 nm reach to 0.6. IPTG was added to the cultures to a final concentration of 0.3 mM. After a further 3 hr, bacterial cells were collected and analyzed. Lane 1, protein molecular size markers in kDa; lanes 2 and 3, strain containing pMalc2; lanes 4 and 5, strain containing pMal-IN; lanes 3 and 5, IPTG added.

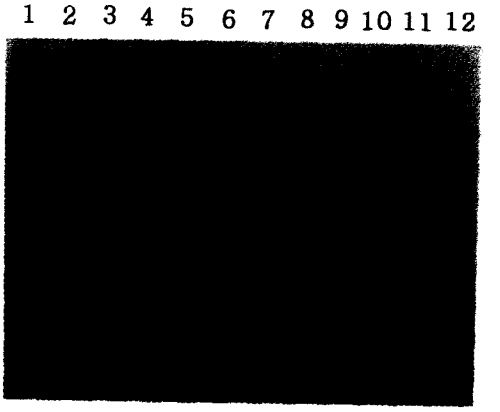


**Fig. 3** — Purification of a MBP-IN fusion protein using an amylose affinity chromatography. A bacterial pellet from a 500 ml culture treated with IPTG was resuspended and sonicated. The clear supernatant was collected and passed through an amylose column. Lane 1, supernatant; lane 2, flow-through; lane 3, washout; lanes 4-12, eluate in 10 mM maltose.

**융합단백질의 정제** – 융합단백질의 정제는 융합단백질의 일부인 맥아당결합단백질이 amylose잔기에 결합하는 성질을 이용하였다.[14, 15] 융합단백질의 생성이 확인된 배양의 박테리아펠렛을 1 M NaCl를 함유하는 인산완충용액에서 초음파파쇄기로 파괴하여 세포내의 단백질들이 세포밖으로 나오도록하고 원심분리 후 상등액을 amylose resin을 통과시켜서 결합된 단백질들을 맥아당용액으로 추출하였다 (Fig. 3). 융합단백질의 amylose 잔기에 대한 결합은 매우 효과적으로, 원심분리 후 상등액에 있던 많은 융합단백질들은 amylose resin을 통과한 여과액에서는 상당부분 결합하고, 소량만이 남아있다 (lanes 1 and 2). Amylose resin을 충분히 세척 후 10 mM 맥아당용액으로 결합된 단백질들을 추출하였을 때, 두번째 및 세번째 분획에서 가장 많이 추출되었다 (lanes 4 and 5). 세번째 분획의 경우 섞여있는 약 5 % 정도의 박테리아의 단백질을 포함하여 농도가 약 12 mg/ml이다. 이러한 용해도는 기존에 integrase의 생산에 이용되는 다른 방법들에서의 integrase의 용해성과 비교하여 약 4 배 높은 것이다. Integrase는 일반용액에서 용해성이 매우 낮다. 따라서, 여러번의 컬럼을 거치는 전형적인 생화학적인 방법에 의한 정제는 매우 어렵다. 이러한 이유에서 현재 많은 연구자들은 사용하는 방법은 두가지 특징이 있다. 첫째, histindine 표식을 이용한 affinity 정제방법으로, integrase 단백질의 앞 또는 뒷부분에 몇 개의 histidine잔기를 붙여서 니켈이 붙은 컬럼을 이용하여 한번의 컬럼 정제과정만으로도 상당히 순수한 단백질을 얻는다.[13, 16-18] 둘째, 박테리아를 분쇄하는 용액에 계면활성제로 CHAPS를 첨가하였다. 이계면활성제는 histidne표식을 함유하는 integrase의 용해성을 높여준다. CHAPS 이외의 다른 많은 계면활성제들이 조사되었으나, 단백질을 변성시키지않고 CHAPS보다 용해성을 높이는 것은 보고되지않고있다.[13, 16] 그러나, 이런 방법도 integrase의 용해성을 3 mg/ml 이상 높이기 어렵기 때문에 단백질구조 연구에 많은 어려움이 있다. 또한 integrase의 활성억제제의 탐색이나 단백질의 구조 연구를 위한 대량 생산에는 CHAPS가 매우 고가이기 때문에 histidine표식을 이용하는 방법의 사용이 제한되고있어, 새로운 방법의 개발이 요구되고있다. 따라서, 용해성이 좋은 맥아당단백질을 이용하여 CHAPS를 사용하지않고 integrase를 고농도의 융합단백질의 형태로 생산하는 것도 이러한 문제점을 극복하는 하나의 선택이 될 수 있다. 본실험에서는 융합단백질의 효소적 활성을 조사하기위하여 세번째 분획의 단백질들을 2 mg/ml로 희석하여 융합단백질의 integrase의 활성을 분석하였다.

**융합단백질의 integrase 활성** – *In vitro*에서 리트로

바이러스 integrase의 활성은 바이러스 DNA의 염기서열을 닮은 이중가닥의 oligonucleotide를 이용하여 측정 할 수 있다.[3,4] *In vitro*에서 integrase는 이중가닥 oligonucleotide중 한쪽가닥의 3′ 말단에 있는 두 개의 잔기를 선택적으로 짤라낸다. 본연구에서는 짤라질 가닥의 oligonucleotide의 5′ 말단을 방사능으로 표식하고 3′ 말단의 두 잔기가 짤라져서 짧아지는 oligonucleotide의 크기 변화를 관측함으로써 융합단백질의 integrase 활성을 측정하였다 (Fig. 4A). 리트로바이러스 integrase의 조효소로 알려진 망간과 마그네슘의 농도를 변화시키면서 integrase의 endonucleolytic 활성을 조사하였을 때, 0.1~1.0 mM $Mn^{++}$에서는 상당한 활성을 나타내었으나, $Mg^{++}$의 경우 어떠한 농도에서도 활성을 보이지 못하고있다 (Fig 4B; lanes 4-11). 이결과는 융합단백질의 integrase 활성은 망간을 조효소로 필요로 하여, histidine표식된 integrase와 같은 성질을 보여주고있다.[13] 또한 10 mM $Mn^{++}$또는 $Mg^{++}$에서는 oligonucleotide의 잔기들이 하나씩 짤려짐으로써, integrase의 활성이 억제된 가운데 섞여있는 nuclease의 활성이 작용함을 보여준다(Fig. 4B; lanes 7 and 11). 이러한 비특이적인 절단은 본연구에 이용된 integrase들이 한 단계과정만으로 정제되어 박테라아에서 유래된 nuclease가 integrase시료속에 포함되어 나타나는 것으로 사료된다. 융합단백질의 integrase 활성의 적합한 발현 조건을 조사하기 위하여 활성 측정반응에 β-mercaptoethanol, $CaCl_2$, 또는 EDTA 등을 첨가해 보았을 때, β-mercaptoethanol을 20 mM 수준까지 첨가한 경우가 더 좋은 활성을 보여준다 (Fig. 5; lanes 5-7). 최종농도로 1 mM EDTA의 첨가는 부분적 활성을 보여주며, 그이상의 농도에서는 반응용액중의 망간이온을 완전히 제거하여 반응을 억제한다.

리트로바이러스 integrase는 끝에 두 개의 nucleotide가 제거된 바이러스 DNA를 숙주세포의 DNA나 자신의 바이러스 DNA의 비특이적 부위를 끊고 연결시

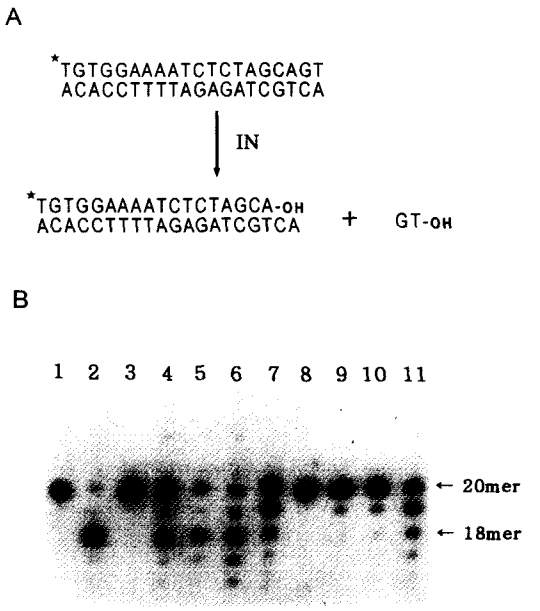


**Fig. 4** — Endonucleolytic activity of a MBP-IN fusion protein in the presence of metal ions. (A) Schematic diagram of endonucleolytic reaction. (B) Endonucleolytic activity of a MBP-IN. Proteins (MBP-IN or hisitine-tagged IN) of 30 pmol were incubated at 33℃ for 90 min with radiolabelled duplex oligonucleotide of 0.1 pmol in 10 mM TrisHCl (pH 7.4) containing the components indicated below: lane 1, oligonucleotide only; lane 2, histidine-tagged IN with 1 mM $Mn^{++}$; lane 3-11, MBP-IN; lanes 4-7, 0.1, 0.5, 1 and 10 mM $Mn^{++}$; lanes 8-11, 0.1, 0.5, 1 and 10 mM $Mg^{++}$ respectively.

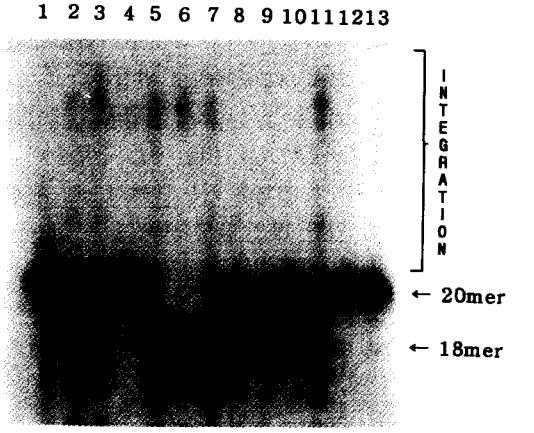


**Fig. 5** — Effect of various buffer components on endonucleolytic activity of a MBP-IN fusion protein. The basic reactions were formulated in the presence of 1 mM $Mn^{++}$ as described in Fig. 4. Additional components were added to the reaction as follows: lane 1, oligonucleotide only; lane 2, histidine-tagged IN; lanes 3-13, MBP-IN; lane 4, $Mn^{++}$ omitted; lanes 5-7, 10, 20 and 50 mM -MeOH; lanes 8-10, 10, 20 and 50 mM $CaCl_2$; lanes 11-13, 1, 3 and 5 mM EDTA respectively.

키는 중합활성이 있다. *In vitro*에서 이활성은 endonucleolytic 활성에 의하여 두 개의 nucleotide가 제거되고, 방사능으로 표식된 oligonucleotide를 다른 oligonucleotide의 중간부위에 비특이적으로 끊고, 연결함으로써 방사능으로 표식된 oligonucleotide의 크기가 증가하는 것으로 측정할 수 있다. 맥아당결합 단백질과의 융합단백질로 존재하는 integrase는 histidine으로 표식된 integrase에 비하여 endonucleolytic 활성이 뛰어나지는 못하다. 그러나, 맥아당결합단백질과의 융합단백질을 사용한 반응들에서 DNA기질의 20 mer 위부분에 중합된 생성물이 더 강하게 나타나므로, integrase의 endonucleolytic 활성에 의하여 절단된 oligonucleotide가 다른 DNA에 들어가는 중합활성은 융합단백질이 더 강한 것으로 사료된다(Fig. 5; lane 2 vs lanes 3, 5-7, and 11).

면역결핍바이러스의 integrase의 효소활성은 단백질의 중앙영역에서 나타난다. 그러나, N-말단영역이나, C-말단영역을 부분적으로 제거한 돌연변이들도 효소활성을 쉽게 상실하여 전체적인 단백질의 구조가 중요하다.[16,19] 이것은 효소활성이 두 개 이상의 integrase가 결합된 중합체에서만 나타나기 때문으로, 중합체의 형성을 위한 단백질 사이의 결합은 N-말단영역을 통하여 일어난다.[20] 따라서, 융합단백질이나 histidine이 표식된 integrase의 경우 중합체 형성을 위한 N-말단 구조의 순수성이 필요하다. 현재 많이 사용되는 histidine으로 표식된 integrase의 경우 N-말단에 12~20개 정도의 아미노산이 추가되나, 효소활성의 발현에는 거의 영향을 주지않고있다.[13,16-18] 분자량이 42,700 Da인 맥아당결합단백질이 N-말단에 결합된 integrase의 경우 정상적인 중합체의 형성이 어려울 것으로 사료되나, 부분적인 효소활성을 보이는 것으로 보아 융합단백질의 구조에 많은 흥미를 갖게한다. 또한, 이러한 결과는 integrase가 감염된 바이러스에서 생성될 때 polyprotein의 일부로 생성되어 바이러스 조립과정에 단백분해효소에 의하여 절단되어 활성을 갖는 것으로 알려지고있으나, polyprotein의 형태에서나, 부분적으로 절단된 형태에서도 활성을 나타낼 수도 있음을 시사한다.

## 감사의 말씀

본연구는 1996년도 중앙대학교 학술연구지원비에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1) Brown, P. O. : Integration of retroviral DNA. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **157**, 19 (1990).
2) Bushman, F. D., Fugiwara, T. and Craigie, R. : Retroviral DNA integration directed by integration protein *in vitro*. *Science* **249**, 1555 (1990).
3) Craigie, R., Fugiwara, T. and Bushman, F. D. : The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration *in vitro*. *Cell* **62**, 829 (1990).
4) Katz, R. A., Merkel, G. W., Kulkosky, J., Leis, J. and Skalka, A. M. : The avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integrative recombination *in vitro*. *Cell* **63**, 87 (1990).
5) Vink, C., van Gant, D. C., Elgersma, Y. and Plasterk, R. H. A. : Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. *J. Virol* **65**, 4636 (1991).
6) Bushman, F. D. and Craigie, R. : Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein *in vitro*: Specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1339 (1991).
7) Sherman, P. A. and Fyffe, J. A. : Human immunodeficiency virus integration protein expressed in Escherichia coli possesses selective DNA cleaving activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5119 (1990).
8) LaFemina, R. L., Callahan, P. L. and Cordingley, M. G. : Substrate specificity of recombinant Human immunodeficiency virus integrase protein. *J. Virol.* **65**, 5624 (1991).
9) Kulkosky, J., Jones, K. S., Katz, R. A., Mack, J. P. G. and Skalka, A. M. : Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial sequence transposases. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2331 (1992).
10) Vink, C., Groeneger, A. A. M. and Plasterk, R. H. A. : Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *Nucleic Acid Res.*

**21**, 1419 (1993).

11) Vink, C. and Plasterk, R. H. A. : Activities of feline immunodeficiency virus integrase protein produced in *Escherichia coli*. *J. Virol* **68**, 1468 (1994).

12) Jenkins, T. M., Hickman, A. B., Dyda, F., Ghirlando, R., Davies, D. R. and Craigie, R. : Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: Identification of soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. *Proc.. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6057 (1995).

13) Oh, J.-W. and Shin, C.-G. : Purification and characterization of the Human immunodeficiency virus type 1 integrase expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Cells*, **6**, 96 (1996).

14) Kellerman, T. C. and Ferenci, T. : Maltose binding protein from *E. coli*. *Methods in Enzymology* **90**, 459 (1982).

15) Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. and Inouye, H. : Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21 (1987).

16) Bushman, F. D., Engelman, A., Palmer, I., Wingfield, P. and Craigie, R. : Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3428 (1993).

17) Katzman, M. and Sudol, M. : *In vitro* activities of purified Visna virus integrase. *J. Virol*. **68**, 3558 (1994).

18) Balakrishnan, M., Zastrow, D. and Jonsson, C. B. : Catalytic activities of the human T-cell leukemia virus type II integrase. *Virology* **219**, 77 (1996).

19) Drelich, M., Wilhelm, r. and Mous, J. : Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro. *Virology* **188**, 459 (1992).

20) Jones, K. S., Coleman, J., Merkel, G. W., Laue, T. M. and Skalka, A. M. : Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J. Biol. Chem*. **267**, 16037 (1992).