

인간 포미바이러스 인테그라제의 핵위치 신호

오수아 · 강승이 · 한성태 · 안덕근 · 신차균*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과, 중앙대학교 생명환경연구원

(Received January 9, 2006; Revised March 21, 2006)

Nuclear Localization Signal of Human Foamy Virus Integrase

Soo A Oh, Seung Yi Kang, Sung Tae Han, Dog Gn An and Cha-Gyun Shin*

Department of Biotechnology and BET Research Institute, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

Abstract — Human foamy virus (HFV) integrase mediates integration of viral c-DNA into cellular DNA. In this process, HFV preintegration complex (PIC) in which integrase is a key component moves to nuclei of the infected cells and leads to integration of viral DNA to the cellular genome, which is essential in viral life cycle. In general nuclear localization signals (NLS) have been suggested to be involved in localizing retroviral PIC to nuclei, but the mechanisms for nuclear localization of the HFV PIC remains unclear. To functionally identify the NLS of HFV integrase, various subdomains of the protein were expressed as GFP fusions and their subcellular locations were analyzed with confocal laser scanning microscopy. Wild type HFV integrase was karyophilic by targeting the fusion protein to nuclei of the COS-1 and 293T cells. Our results showed that strong NLS of HFV integrase was mapped to the C-terminal regions. In addition the karyophilic properties of N-terminal and central regions are not individually strong enough to direct localization of the fusion proteins to nuclei, but their cooperative activity for nuclear import was confirmed.

Keywords □ HFV, integrase, nuclear, localization, signal

리트로바이러스는 생물학적 특성과 구조적 특성에 따라 oncovirus, lentivirus, spumavirus로 분류한다. Oncovirus와 lentivirus는 인간과 동물에서 암, 면역결핍증과 같은 치명적 질병을 일으키는 관계로 많은 연구가 되어있다. Spumavirus는 최근에 여러 질병에서 발견되어 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다.¹⁻⁴⁾ 인후암 환자에서 처음 발견된 후, 간염환자에게서도 발견되고 있어 인간에게 질병을 유발할 수 있는 가능성을 보여 주고 있는 인간 포미바이러스(human foamy virus, HFV)는 spumavirus의 하나로서, 유전자의 구성에 있어서 일반적인 리트로바이러스 유전자 구성과 유사한 형태를 보이고 있다.^{5,6)} HFV는 약 12 kb의 동일한 2개의 RNA를 바이러스 유전자로 보유하고 있어, 리트로바이러스 중에서 가장 큰 유전자를 함유한다. 리트로바이러스는 숙주세포에 감염과정에서 바이러스가 세포의 원형질에 침투한 후, RNA 유전자는 역전사효소에 의하여 이중나

선의 DNA로 전환되고, 바이러스의 일부 단백질과 복합체(preintegration complex, PIC)를 형성한다. 이 복합체는 핵 안으로 이동하고, 세포의 유전자 안으로 바이러스 DNA 유전자를 삽입한다. 바이러스 유전자가 복제되고, 자손바이러스를 생산하기 위해서는 바이러스 유전자의 세포 유전자로의 삽입이 필수불가결하며, 이러한 과정은 바이러스 특유의 효소, 인테그라제에 의하여 매개된다.^{7,8)}

리트로바이러스의 인테그라제들의 구조는 기능적으로 3 개의 부분(N-말단영역, 중앙영역 및 C-말단영역)으로 구분한다.^{9,10)} N-말단영역은 Zn-finger 구조(His-His-Cys-Cys)가 존재하며, 인테그라제가 작용할 때 이량체 또는 다량체를 형성하게 한다. 중앙영역은 효소활성을 나타내는 영역으로, N-말단영역과 함께 다른 모든 리트로바이러스에서 아미노산 서열이 잘 보존되어 있다. 그러나 DNA-결합영역으로 알려진 C-말단영역은 상대적으로 아미노산 서열이 덜 보존되어 있다.^{9,10)}

리트로바이러스 DNA 유전자와 단백질의 복합체가 감염된 세포의 핵 안으로 들어가는 과정은 복합체에 존재하는 바이러스 단백질들의 핵위치 신호(nuclear localization signal, NLS)와 세포

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-670-3067 (팩스) 031-675-0409
(E-mail) cgshin@cau.ac.kr

의 원형질 단백질인 importin 등이 관여한다. 면역결핍바이러스의 경우, 바이러스 DNA가 matrix 단백질, Vpr, 인테그라제 등에 존재하는 핵위치 신호에 의하여 핵 안으로 유도되는 것으로 알려져 있다.^{11,12)} 특히 이 과정에서 인테그라제 단백질은 바이러스 DNA의 핵 안으로의 도입과 세포 유전자로의 삽입 등에 직접적으로 관여하고 있다. 현재 밝혀진 면역결핍바이러스 인테그라제의 핵위치 신호는 중앙영역의 186-188번 잔기와 C-말단영역의 211-219번 잔기들에 존재하여 이분화 되어 있다.¹³⁾ Avian sarcoma 바이러스 인테그라제는 C-말단영역의 앞부분인 201-235번 잔기들에 핵위치 신호를 보유하고,¹⁴⁾ 고양이 면역결핍바이러스의 인테그라제는 N-말단영역에 강력한 핵위치 신호를 함유하고 있다.¹⁵⁾

인간 포미바이러스의 인테그라제는 아직까지 자세한 단백질 영역의 분석이나, 유전학적인 특성이 보고되지 않았다. 본 연구에서는 유전자 조작 방법을 통하여 녹색형광단백질과 다양한 크기의 인간 포미바이러스 인테그라제 단백질의 융합 단백질에 대한 발현 벡터를 제작하고, 이를 배양세포에 도입하여 세포 안에서 녹색형광이 나타나는 위치를 추적하여 인간 포미바이러스 인테그라제의 단백질 영역 중에서 핵위치 신호를 보유하고 있는 영역을 조사하였다.

실험 방법

시약 및 재료

각 돌연변이 인테그라제의 발현벡터 제작과 염기서열 확인을 위한 올리고핵산들은 Takara(Korea)에서 제작하였다. *Pfu* polymerase는 Promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 제한효소 및 T4 DNA ligase는 New England Biolabs(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)와 fetal calf serum은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였다. Transfection 시약은 SuperFect(QuiaGen, Chatsworth, USA)를 사용하였다. 그 외의 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

벡터 제작

인간 포미바이러스의 정상적인 인테그라제와 돌연변이 인테그라제는 각각 녹색형광단백질(EGFP)의 C-말단에 융합시켰다. 정상적인 인테그라제의 융합단백질을 생산하는 발현하는 벡터의 제작을 위하여, 본 실험실에서 예전에 이미 발표한 pETFIN을 template로 하여 전체 길이의 인테그라제 유전자를 증폭하였다.^{16,17)} 이때 사용한 primer는 FN6(5'-gccgcaagcttcatatgaaggatgcc-3', forward)와 FC6A(5'-tgccgggtacctctttttccaatgatcc-3', reverse)이다. 증폭된 유전자는 *Hind*III 또는 *Kpn*I으로 각각 처리하고, 미리 같은 제한효소로 처리된 pEGFP-C3에 클로닝하여 완성하

였다.

인간 포미바이러스 인테그라제의 N-말단영역, 중앙영역, C-말단영역의 구분은 본 실험실에서 예전에 보고한 것과 같이, 기존에 잘 알려진 인간 면역결핍바이러스 인테그라제의 아미노산 서열과 포미바이러스 인테그라제의 아미노산 서열을 비교하여 결정하였다.¹⁷⁾ 포미바이러스 인테그라제 deletion 돌연변이의 융합 단백질의 발현벡터 제작은 먼저 각 돌연변이들을 다음의 primer들을 사용하여 증폭하고, 증폭된 유전자를 위에서와 같은 방법으로 클로닝하였다. 돌연변이 1-88과 1-288는 primer로 각각 FN6, FC88AA(5'-aataggtaccgaggcttgggaagcatttg-3', reverse)와 FN6, HF288AA(5'-acgagaggtaccgggggtggatggatg, reverse)를 사용하여 증폭하였다. 돌연변이 89-288과 89-371은 primer로 각각 HF89SS(5'-gctccaagcttcatatggctcttctaagacc-3', forward), HF288AA와 HF89SS, FC6A를 사용하였다. 돌연변이 289-371은 primer로 HF289SS(5'-catccaagcttcatatggctctctctgcttctgg-3', forward)와 FC6A를 사용하였다. 제작된 벡터들은 DNA sequencing으로 염기서열의 정확성을 확인하였다.

세포배양 및 Transfection

COS-1 세포와 293T 세포는 10% FBS와 페니실린, streptomycin을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다. Transfection을 위하여 하루 전에 1.8×10^4 세포를 8-well chambered coverglass (Nalge Nunc, Naperville, USA)에 접종하였다. 24시간 후 배양 용기 표면의 약 70%를 세포가 덮었다. Transfection은 SuperFect를 사용하여 제조회사의 실험방법에 따라 실시하였다. 먼저 혈청이 없는 배지 30 μ 에 약 1 μ g의 DNA를 첨가하고, 잘 섞은 후 2.5 μ l의 SuperFect와 혼합하고 10분간 실온에 방치하고 150 μ l의 혈청함유 DMEM 배지와 혼합하여 DNA-transfection 용액을 준비하였다. 배양세포의 상등액을 제거하고, 37°C의 인산완충용액으로 세포들을 세척하고, 미리 준비한 DNA-transfection 용액을 첨가하였다. 3시간 배양 후 배지를 제거하고, 인산완충용액으로 세척하고, 10% 혈청함유 DMEM 배지를 넣고 48시간 배양 후 confocal microscope(LSM-510-Meta, Carl Zeiss)로 관찰하였다.

결과 및 고찰

융합단백질의 발현벡터 제작

리트로바이러스의 인테그라제 유전자는 바이러스의 *pol* 유전자의 끝부분에 붙어있으며, 인테그라제 단백질은 *gag-pol* 또는 *pol* 유전자의 발현으로 polyprotein으로 생성되어 바이러스 조립 단계에서 바이러스 입자가 감염 세포의 막에서 성숙되어 가는 과정에서 단백질해 효소에 의하여 polyprotein에서 절단되어 활성화된다.¹⁸⁾ 지금까지의 리트로바이러스 인테그라제의 기능적 영

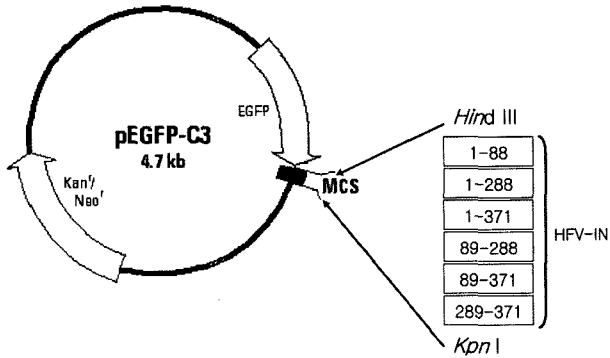


Fig. 1 - Schematic representation of the HFV-IN-EGFP expression vector. The full-length wild type or truncated HFV integrase DNA was amplified with *pfu* polymerase, digested with *Hind*III and *Kpn*I, and cloned into the pEGFP-C3 vector.

갖고 있음을 보여준다.^{18,19)} 인간 포미바이러스 인테그라제 단백질의 기능적 영역은 보고되어 있지 않으나, 최근에 본 연구실에서 인간 면역결핍바이러스 인테그라제와 아미노산 서열을 비교하여 제작한 deletion 돌연변이들의 연구로서 기능적 영역을 보고하였다.¹⁷⁾ 인간 포미바이러스 인테그라제 단백질은 총 371개의 아미노산으로 구성된다. N-말단영역은 Zn-finger 구조를 형성하는 HHCC motif를 포함하여 아미노산 1번에서 88번까지이며, 중앙영역은 효소의 촉매적 잔기로 작용하는 것으로 알려진 DD(35)E motif를 포함하여 89번에서 288번까지이며, C-말단영역은 상대적으로 보존적인 아미노산들이 적은 289번에서 371번까지로 나눌 수 있다.¹⁷⁾ 본 연구에서 제작한 녹색형광단백질과 포미바이러스 인테그라제의 융합단백질의 발현벡터는 본 연구실에서 발표하였던 포미바이러스 인테그라제의 기능적 영역을 바탕으로 제작하였다. 녹색형광단백질의 C-말단에 인테그라제 단백질을 붙이기 위하여, 녹색형광단백질의 발현벡터인 pEGFP-C3의 *Hind*III/*Kpn*I 부위에 증폭된 인테그라제 유전자를 도입하였

역에 대한 많은 연구들은 N-말단영역과 중앙영역은 아미노산 서열이 리트로바이러스 사이에서 매우 보존적이며, 유사한 서열을

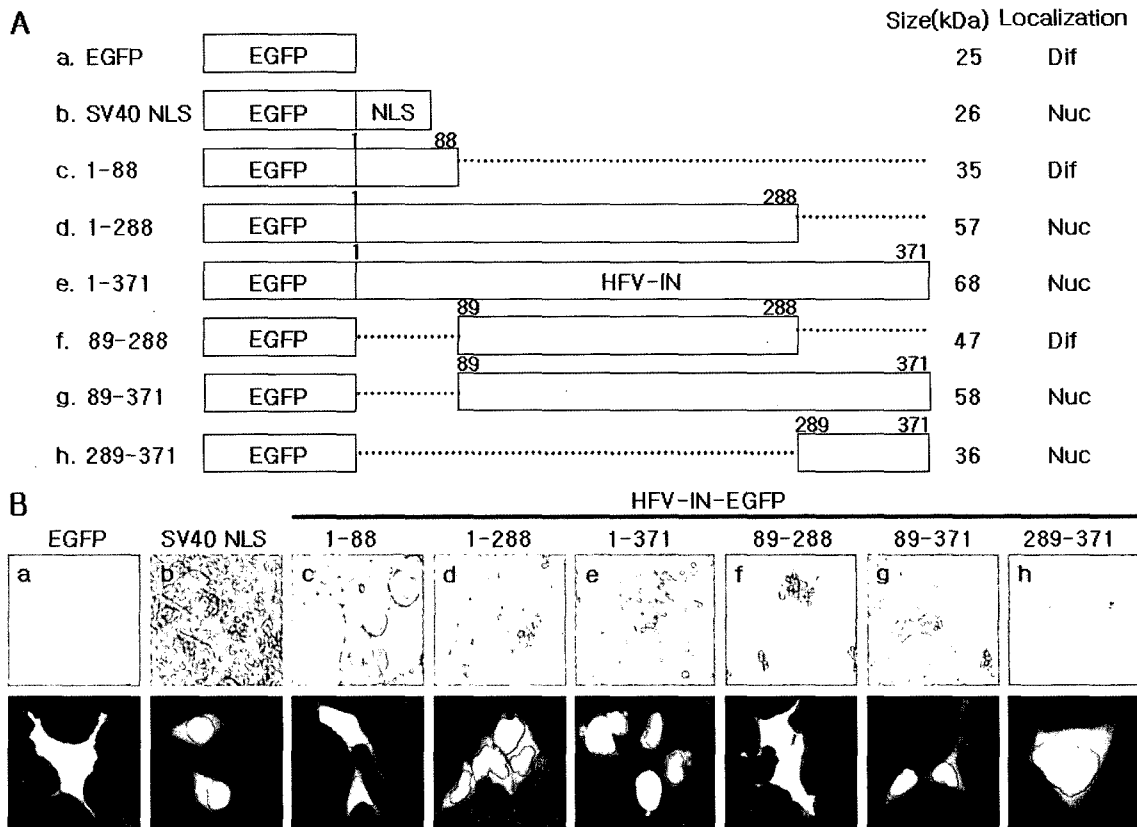


Fig. 2 - Subcellular localization of the HFV-IN-EGFP fusion proteins in the COS-1 cells. (A) DNA constructs of fusion proteins. The DNA encoding wild type or truncated HFV integrase was fused to the C-terminus of EGFP, a redshifted variant of green fluorescence protein optimized for expression. The expected molecular mass (in kilodaltons) and subcellular localization of each fusion protein are indicated to the right of the corresponding construct. Nuc indicates that fluorescence was localized predominantly to the nuclei of transfected cells, and Dif indicates that fluorescence was distributed evenly throughout transfected cells. (B) Subcellular localization. Plasmid DNA (1 ug) was transfected into approximately 1.8×10^4 COS-1 cells by using the transfecting reagent Superfect. Forty-eight hours posttransfection, the localization of the fusion proteins were investigated. Top panels are phase contrast images and bottom panels are fluorescence images showing the same fields selected for the indicated fusion proteins.

다(Fig. 1).

포미바이러스 인테그라제의 핵위치 신호

감염세포의 유전자에 중합되기 위하여 리트로바이러스 DNA는 원형질에서 핵 안으로 이동한다. 이때 리트로바이러스 DNA의 핵 안으로의 이동을 유도하는 단백질은 아직 정확히 규명되어 있지 않으나, 바이러스의 matrix 단백질과 인테그라제가 각각 또는 함께 작용할 것으로 사료된다.¹¹⁾ 현재까지 규명된 인테그라제 단백질들의 핵위치 신호의 존재하는 위치와 아미노산 특성에는 특정한 규칙이 발견되지 않고 있다. 특히 인간 포미바이러스 인테그라제의 핵위치 신호에 대하여는 어떠한 보고도 되어 있지 않다. 본 연구에서 포미바이러스 인테그라제의 핵위치 신호가 인테그라제 단백질의 어떤 영역에 존재하는가를 규명하기 위하여, 위에서 제작한 융합단백질들의 발현벡터들을 COS-1 세포와 293T 세포에 도입하였다. 본 연구에서 핵위치 신호에 대한 음성대조군으로는 pEGFP-C3 vector 자체를 사용하였고, 양성대조군으로는 강력한 핵위치 신호를 보유한 SV40 바이러스의 large

T-형원의 핵위치 신호를 도입한 pEGFP-C3-SV40 NLS를 사용하여 위에서와 동일한 방법으로 연구하였다.¹⁵⁾ 음성대조군인 pEGFP-C3 벡터를 도입한 COS-1 세포에서는 녹색형광단백질이 COS-1 세포의 원형질과 핵의 전체에 퍼져있고(Fig. 2a), 대조적으로 양성대조군인 SV40 핵위치 신호를 붙인 녹색형광단백질은 핵 안으로 집중되어 있다(Fig. 2b). 포미바이러스의 정상적인 전체 인테그라제 단백질이 융합된 경우에는 녹색형광단백질이 세포의 핵 안에 강력하게 집중되는 형태를 보여주고 있다(Fig. 2e). 이러한 특성은 인테그라제의 핵 친화적 특성을 나타내는 것으로 인테그라제가 바이러스 DNA를 핵 안으로 이끌고 들어 갈 수 있는 성질을 나타낸다. 그러나 deletion 돌연변이들을 융합한 경우에는 융합된 부위에 따라 녹색형광단백질의 분포가 달라지는 것을 알 수 있었다. 인테그라제의 N-말단영역 또는 중앙영역만을 함유하는 융합단백질들은 녹색형광이 세포의 원형질과 핵에 전반적으로 퍼져 있는 결과를 보여준다(Fig. 2c and f). 그러나 C-말단을 함유하는 융합단백질은 핵 안에 집중적으로 배치되는 모습을 보여 주어, 포미바이러스 인테그라제의 C-말단에 강력한 핵

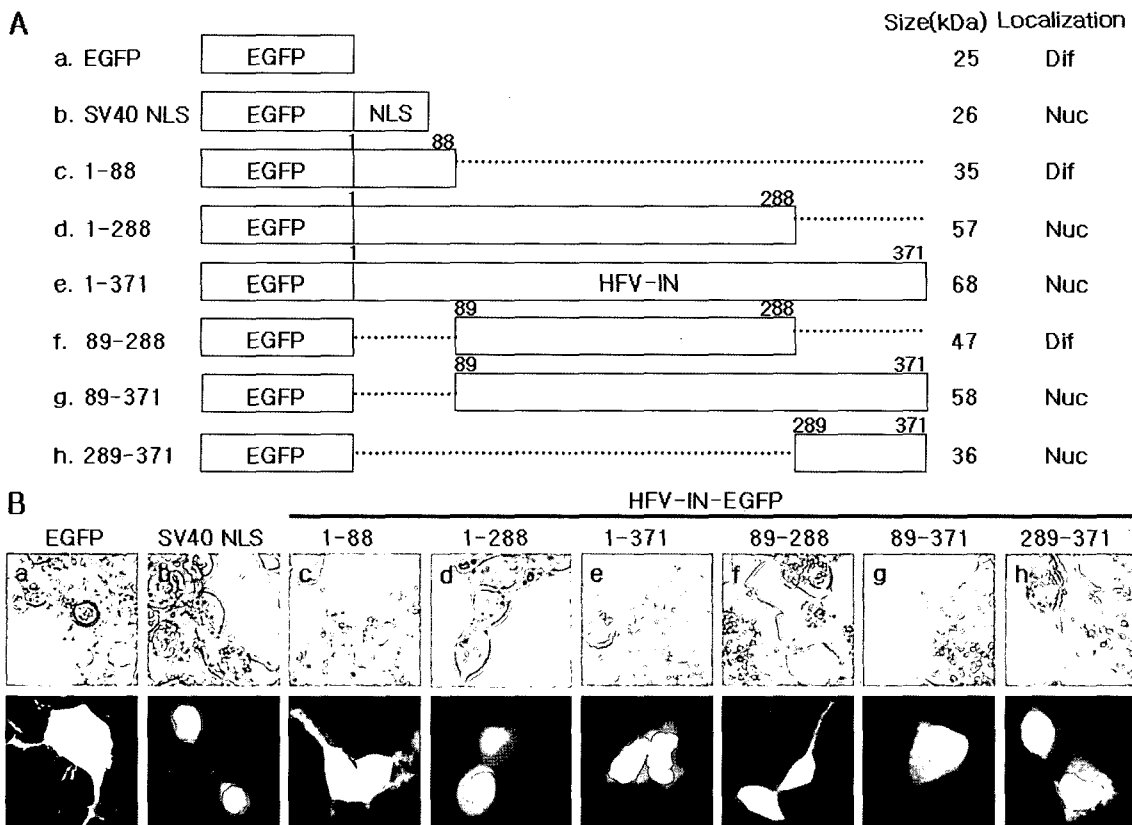


Fig. 3 - Subcellular localization of the HFV-IN-EGFP fusion proteins in the 293T cells. (A) DNA constructs of fusion proteins. The DNA encoding wild type or truncated HFV integrase was fused to the C-terminus of EGFP. The expected molecular mass (in kilodaltons) and subcellular localization of each fusion protein are indicated to the right of the corresponding construct. Nuc indicates that fluorescence was localized predominantly to the nuclei of transfected cells, and Dif indicates that fluorescence was distributed evenly throughout transfected cells. (B) Subcellular localization. 293T cells were transfected with the indicated DNA constructs and analyzed as described in the legend Fig. 2B.

위치 신호가 있음을 제시한다(Fig. 2h). 또한 인테그라제의 C-말단만 제거되거나, N-말단만 제거된 융합단백질의 경우, 녹색형광들이 세포의 핵 안에 집중되어, 이들 부위에도 핵 위치신호가 존재하고 있음을 암시한다(Fig. 2d and g). 이러한 결과는 N-말단 영역 또는 중앙영역만이 존재하는 융합단백질이 원형질과 핵 전체에 퍼져있는 것과 비교하여 볼 때, N-말단영역과 중앙영역에는 각각의 융합단백질을 핵 안으로 이끌고 갈 정도의 강력한 핵 위치 신호는 존재하지 않으나, N-말단영역과 중앙영역이 합하여지면, 융합단백질을 핵 안으로 이끌고 갈 수 있는 강한 핵 위치 신호를 창출할 수 있음을 제시한다(Fig. 2c, d and f). 이러한 결과들은 인간 신장세포인 293T 세포에서 반복하여 실험하였을 때에도 동일한 결과를 보여 주고 있다(Fig. 3).

단백질이 원형질에서 핵 안으로 들어가기 위해서는 핵막에 존재하는 핵공을 통과하여야 한다. 확산에 의하여 핵공을 자유롭게 통과하여 핵 안으로 들어 갈 수 있는 단백질의 크기는 대략 45 kDa 정도인 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 이 크기보다 더 큰 단백질들은 핵 안으로 들어가기 위해서는 단백질 서열 내에 핵 위치 신호를 함유하여야 한다. 그리고 핵 위치 신호를 함유한 단백질들은 핵 안으로 인도하는 단백질들인 importin α , β 등에 의하여, 핵 안으로 들어간다.²¹⁾ 본 연구에서 녹색형광단백질, N-말단 영역 융합단백질과 중앙영역 융합단백질은 확산에 의하여 세포 전체에 분포하는 결과를 보여주고 있다. 그러나 SV40 핵 위치 신호를 함유하는 녹색형광단백질과 C-말단영역의 융합단백질은 분자량이 작아도 강력한 핵 위치 신호를 함유하고 있어서 확산에 의하여 단백질이 세포전체에 퍼지지 않고 적극적으로 핵 안으로 유도되어 핵 안에서 강력한 형광을 보여주고 있다. 또한 분자량 이상대적으로 큰 정상적인 인테그라제의 융합단백질과, N-말단 또는 C-말단영역만 제거된 인테그라제의 융합단백질들은 각각의 인테그라제 단백질의 부위에 존재하는 핵 위치 신호에 의하여 핵 안으로 잘 유도되고 있음을 알 수 있다.

현재까지 밝혀진 많은 핵 위치 신호의 아미노산 서열은 lysine 과 arginine을 많이 포함하고 있다. SV40 바이러스 T-항원의 핵 위치 신호는 PKKKRKKV이며, adenovirus E1A의 핵 위치 신호는 KRPRP이며, 핵 단백질인 nucleoplamin의 핵 위치 신호는 KRPAAIKKAGQAKKKK로서 염기성 아미노산들의 연속된 서열이 주로 핵 위치 신호로 작용하고 있다.²²⁾ 이러한 특징을 고려하여 포미바이러스 인테그라제의 아미노산 서열을 조사하였을 때, 집중적으로 염기성 잔기들이 연속된 존재하는 곳은 존재하지 않았으나, C-말단영역에서 305번부터 318번까지의 서열인 RVARPASLRPRWHK에서 상대적으로 염기성 아미노산의 빈도가 높았다. 따라서 앞으로 이들 아미노산 서열에 대한 점 돌연변이를 제작하여 정확한 핵 위치 신호를 규명하려고 하다.

리트로바이러스의 인테그라제는 바이러스의 증식을 위하여 바이러스에게 반드시 필요한 효소이다. 그러므로 이 효소의 특성

을 정확히 파악하는 것은 인간에게 많은 질병을 일으키고 있는 리트로바이러스의 증식과 전염을 차단 할 수 있는 중요한 정보를 제공 할 수 있을 것이다. 인테그라제의 정확한 핵 위치 신호를 규명하는 것은 이러한 측면에서 매우 의미가 있으며, 또한 인테그라제를 유전자 치료제로 활용하는 데에 있어서 귀중한 자료가 될 것이다.

결 론

녹색형광단백질에 융합단백질을 만들어 조사한 인간 포미바이러스 인테그라제의 핵 위치 신호는 3 부분에 나누어 존재한다. C-말단영역에는 강력한 핵 위치 신호가 존재하며, 이 영역에 존재하는 핵 위치 신호만으로도 융합단백질을 핵 안으로 인도할 수 있다. N-말단과 중앙영역에도 핵 위치 신호가 각각 존재하나, 이들 영역에 존재하는 핵 위치 신호는 각각 작용하는 경우에는 융합단백질을 핵 안으로 인도할 수 없을 정도로 약하나, 두 영역의 핵 위치 신호가 함께 작용하는 경우 융합단백질을 핵 안으로 유도할 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2005학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Malmquist, W. A., van der Maaten, M. J. and Boothe, A. D. : Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electromicroscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* **29**, 188 (1969).
- 2) Riggs, J. L., Oshiro, L. S., Taylor, D. O. N. and Lennette, E. H. : Syncytium-forming agents isolated from domestic cats. *Nature (London)* **222**, 1190 (1969).
- 3) Hooks, J. J. and Gibbs, C. J. : The foamy viruses. *Bacteriological Reviews* **39**, 169 (1975).
- 4) Flugel, R. M. : Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **4**, 739 (1991).
- 5) Achong, B. G., Mansell, P. W. A., Epstein, M. A. and Clifford, P. : An unusual virus from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **46**, 299 (1971).
- 6) Prince, A. M., Williams, B. A. A., Huima, T., Bardina, L. and Brotman, B. : Isolation of a virus from chimpanzee liver cell cultures inoculated with sera containing the agent of non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **11**, 1071 (1984).
- 7) Coffin, J. M. : Replication of retroviridae, In B. N. Fields (ed.) *Virology*. Raven Press, New York, p1437 (1990).

- 8) Goff, S. P. : Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 527 (1992).
- 9) Engelman, A., Bushman, F. D. and Craigie, R. : Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J.* **66**, 3269 (1993).
- 10) van Gent, D., Vink, C., Groeneger, A. M. and Plasterk, R. H. K. : Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains. *EMBO J.* **12**, 3261 (1993).
- 11) Gallay, P., Swinger, S., Song, J., Bushman, F. and Trono, D. : HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**, 569 (1995).
- 12) Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M. and Trono, D. : Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* **70**, 1027 (1996).
- 13) Gallay, P., Hope, T., Chim, D. and Trono, D. : HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9825 (1997).
- 14) Kukolj, G., Jones, K. and Skalk, A. : Subcellular localization of avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases. *J. Virol.* **71**, 843 (1997).
- 15) Woodward, C., Wang, Y., Dixon, W., Htun, H. and Chow, S. : Subcellular localization of feline immunodeficiency virus integrase and mapping of its karophilic determinant. *J. Virol.* **77**, 4516 (2003).
- 16) Kang, S. Y., Oh, S. A., Lee, H. S., Han, S. T., Seo, J.-W. and Shin, C.-G. : Biochemical characterization of human foamy virus integrase. *Yakhak Hoeji* **48**, 13 (2004).
- 17) Kang, S. Y., Oh, S. A., Lee, H. S., Han, S. T. and Shin, C.-G. : Characterization of human foamy virus integrase mutant. *Yakhak Hoeji* **49**, 198 (2005).
- 18) Skalka, A. M. : Integrative recombination of retroviral DNA. In Genetic recombination, R. Kucherlapati and R. Smith, eds., Washington, DC, p701 (1988).
- 19) Varmus, H. E. and Brown, P. : Retroviruses. In Mobile DNA, D. Berg and M. Howe, eds. Washington, DC, p53 (1989).
- 20) Gorlich, D. and Kutay, U. : Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607 (1999).
- 21) Depienne, C., Mousnier, A., Leh, H., Rouzic, E., Dormont, D., Benichou, S. and Dargemont, C. : Characterization of the nuclear import pathway for HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem.* **276**, 18102 (2001).
- 22) Nakielny, S. and Dreyfuss, G. : Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* **99**, 677 (1999).