KOR. JOUR. MICROBIOL. Vol.14, 135~145(1976)

SV 40 바이러스가 유도한 DNA 合成酵素의 特性에 대한 研究

姜 炫 三
(서울大學校 自然科學大學 微生物學科)

Characterizations of DNA-Polymerases Induced by SV40 Virus Infection of African Green Monkey Kidney Cells (AGMK).

KANG, HYEN SAM
(Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University)

Abstracts

Confluent AGMK cells were infected by large plaque SV40 virus. Levels of DNA polymeras (α and β) were measured in the cytoplasm and the cell nucleus. The activities of DNA polymerase-α which found in both the cell nucleus and the cytoplasm were increased approximately eight folds at 48 hours after infection of SV40 virus. Only insignificant but constant amounts of DNA polymerase-β were found either in the nucleus of the SV40 infected cell or of the uninfected cell. The characteristics of the SV40 virus induced DNA polymerases were compared with that of the uninfected cellular DNA polymerase in regard of the effects of pH, salt concentration, NEM concentration and temperature on those enzyme activities. No differential effect was found between both enzymes. Endonuclease activities were examined in the purified DNA polymerase-α and β. The low level of endonuclease activity which might cut SV40 DNA I at one site was observed in the DNA polymerase-α whereas high but nonspecific endonuclease activities were found in the DNA polymerase-β.

序 論

A. Kornberg는 原核細胞인 *Escherishia Coli*로부터 DNA合成酵素를 純粹分離하여 그 特性을 分析한 후 이를 DNA Polymerase I로 命名하고 이 酵素가 *E. Coli*의 DNA를 復製하는데 관여하는 酵素라고 생각하였다 (Lehman etal., 1958). 그러나 1969年에 J. Cairns가 돌연변이 Strain을 研究한 結果 실제로 DNA를 合成할 수 있는 또 다른 酵素가 있다는 것을 示唆한 이후(DeLucia and Cairns, 1969)로 *E. Coli*에서도 DNA polymerase I 이 외에 II와 III 등 새로운 酵素가 發規되고 있으며 이들 酵素의 生物學的 機能도 아울러 究明하고 있다(Gefter et al., 1971; Gefter, 1974; Knippers, 1970; Tait et al., 1974). 이와 동시에 有核細胞인 高等生物에서도 生物의 種에 따라서 2~3種類의 DNA合成酵素의 存在가 보고되고 있다(Chang et al., 1972 Momparler et al., 1973; Probst et al., 1973; Wallace et al., 1971). 이들 酵素들은 分子量, 細胞內에서의 位置, 陽 ion 혹은 陰 ion 樹脂에서의 分離特性 등을 基準으로 하여 分類되였는데 최근에는 A. Weissbach 등에 의하여 分子量이 큰 酵素(>10),000)를 DNA polymerase-α로, 分子量이 적은 酵素(>50,000)를 DNA polymerase-β로 각각 命

名하기로 규정하였다(Weissbach et al., 1975). 組織培養細胞와 動物機管에서 分離한 DNA 合成酵素는 DNA와 견고하게 結合하여 존재하거나 細胞質內에 遊離되여 있다. 그리고 각기 分子量이 다른 DNA合成酵素의 細胞內의 位置는 生物의 種에 따라 다르다. 예로서 쥐및 토끼細胞에는 分子量이 적은(3~4s) DNA polymerase-β는 核과 細胞質 속에서 동시에 存在하고 分子量이 큰(7~9s) DNA polymerase-α는 細胞質에서만 發見된다고 보고되고 있다(Chang et al., 1971, 1972a). 이와 반면에 사람의 癌細胞에서 由來된 KB 혹은 HeLa 細胞에서는 分子量이 적은 酵素와 큰 酵素가 核속에 存在하고 細胞質에는 分子量이 큰 酵素만이 存在한다는 것이 알려 졌다(Sedwick et al., 1972; Wang et al., 1974; Weissbach et al., 1971). 그리고 細胞의 生活史를 통하여 이들 酵素의 活性度를 보면 分子量이 적은 酵素의 活性度는 一定하고 DNA 合成을 필요로 하는 細胞 分裂이 왕성한 細胞에서는 分子量이 큰 DNA合成酵素의 活性度가 增加한다는 사실이 보고된 바 있다(Chang et al., 1973; Chiu et al., 1972; Fansler et al., 1972). SV40 바이러스는 DNA를 遺傳物質로 가지고 있으며 DNA含量이 3×10^6 daltons (Craword and Black, 1964)이고 쥐에 感染하여 癌을 誘發하는 特性을 가지고 있다. 그리고 癌을 誘發하기 위해서는 바이러스의 DNA가 宿主의 DNA 속에 永久結合을 하여야 하며 (Sambrook et al., 1968) 이를 위하여 宿主의 DNA合成을 誘導한다고 보고된 바 있다(Fox and Levine, 1971).

本 實驗의 目的은 SV40바이러스 感染에 의하여 誘導된 DNA合成酵素를 純粹分離하여 그 特性을 分析하고 어떤 形態의 DNA 合成酵素가 誘導되는 가를 밝혀서 이들 酵素에 의한 生物體內에서 可能한 機能을 규명하고자 하였다.

材料 및 方法

1) 바이러스와 細胞

사용된 바이러스는 plaque가 큰 SV40 wild type로서 원숭이의 腎臟細胞를 組織培養하여 0.001 M.O.I. (Multiplicity of Infection)로서 感染하여 얻은 細胞의 extracts를 SV40 바이러스原으로 使用하였다. 그리고 本 實驗에서 使用된 細胞는 원숭이의 腎臟細胞(AGMK)를 組織培養 하였거나, 혹은 오래동안 繼代하여온 CV-1 細胞를 宿主로 使用하였다.

2) DNA合成酵素의 誘導

完全히 한 層자란 AGMK細胞에 M.O.I.가 10이 되게 SV40 바이러스를 感染시킨 후 48時間 후에 細胞를 收穫하여 核質部分과 細胞質 部分을 分離하여 DNA合成酵素原으로 使用하였다.

3) 核과 細胞質의 分離

收穫한 細胞를 低張液(0.001MKPO_4, 0.01M NaCl, 0.001M MgCl, 2mM β-mercaptoethanol, pH 6.8) 속에 넣고 5~10分間 얼음 속에 저장한 후 細胞가 팽창된 뒤에 glass homogenizer에 붓고 5~6번 細胞를 마쇄한다. 깨어진 細胞를 遠心分離機에서 400g로 2~3分間 遠心하면 上登液部分과 核과 破壞되지 않은 細胞는 沈澱되여 구분된다. 上登液部分은 細胞에 있는 DNA合成酵素原으로 使用하고 沈澱된 部分은 收穫하여 다시 0.1% NP40가 包含된 低張液 속에 넣고 얼음속에서 몇번 細胞를 다시 마쇄한다. 그리고 처음과 같이 遠心分離機에 넣고 600g~800g에서 10分間 遠心시키고 沈澱된 核과 細胞破壞物質을 收穫하여 다시 低張液에 넣고 2~3회 마쇄한 다음 20ml의 35% Sucrose 溶液(0.001M KPO_4, 0.01M NaCl, 0.001M $MgCl_2$, 2mM β-mereartoethanol, pH 6.8) 위에 얹고 3,000rpm에서 10分間 遠心시키면 이때 沈澱된 部分은 거의 純粹한 核이며 따라서 이들 核에 存在하는 DNA合成酵素를 原으로 使用하였다.

4) DNA合成酵素의 抽出

核속에 있는 DNA合成酵素의 抽出은 먼저 純粹分離된 核部分을 最終鹽의 濃度를 1M로 조정한 후 얼음 속에서 3~4時間 동안 Magnetic Stirrer로 친탕하여 軸出한 뒤에 105,000g에서 3~4時間 遠心分離하여 그 上登液을 2mM β-mereaptoethanol, 0.02M KPO_4, pH 7.2 완충액에 투석시키거나 혹은 蒸溜水로 0.01M NaCl 이하로 희석시켜 DEAE-cellulose 樹脂에 適用하였다. 그리고 細胞質에 存在하는 DNA合成酵素는 위의 方法 3항에서 얻은 上登液을 완충액에 2mM β-mercaptosthlanol, 0.02M KPO_4, pH7.2 투석시킨 후에 DEAE-cellulose 樹脂에서 分離하였다.

5) DNA合成酵素의 純粹精製

먼저 낮은 속도의 遠心分離로 細胞內의 各 細胞機管과 細胞膜 등 破壞物을 除去하고, DEAE-cellulose 樹脂로서 分離시켜 얻은 酵素部分을 모아서 ammonium sulfate로 70% 포화시켜 Sorvall 遠心分離機를 使用하여 SS-34 rotor로서 100,000g로 10分間 遠心하여 沈澱시킨다. 沈澱된 部分을 低張液(0.001M KPO_4, 0.01M NaCl, 0.001M $MgCl_2$, 2mM β-marcaptoethanol, pH 7.2)에 녹여서 0.2ml의 몫을 미리 준비하여 만든 5ml의 15~30% glycerol gradient (0.001M KPO_4, 0.01M NaCl, 0.001M $MgCl_2$, 2mM β-mercaptoethanol, pH 7.2)위에 얹고 Beckman 초원심 분리기를 사용하여 SW-65 rotor에서 60,000rpm, 4°C에서 5時間 遠心하여 얻은 酵素를 最終實驗에 使用하였다.

6) 遠心分離機에 의한 合成酵素의 分子量測定

遠心分離에 의한 合成酵素의 精製 방법과 同一하되 단지 0.2ml의 DNA合成酵素原속에 이미 그 分子量을 알고 있는 C^{14}-tRNA (4s)를 分子量의 표준치로 하고 혼합하여 같은 조건하에서 遠心시킨 후 0.15ml씩 재료를 gradient의 밑으로 부터 채취하고 C^{14}의 방사선세기와 DNA合成酵素의 活性度를 測定하여 gradient 내에서 沈澱된 위치를 밝혀 tRAN의 分子量을 기준으로 DNA合成酵素의 分子量을 定하였다.

7) Endonuclease酵素의 activity測定

2μg의 H^3-SV40 DNA I 기질에 2μg의 核 혹은 細胞質 酵素를 가한 후 최종 농도로 0.02M $MgCl_2$로 조정한 후 37°C에서 30分~1時間 동안 반응시킨 후에 0.1M되게 EDTA를 가하여 반응을 정지시킨다. 0.2ml의 몫을 미리 준비한 5ml의 중성, 혹은 알카리성 5~20% Sucrose gradient (1.0M NaCl, 0.001M EDTA, 0.01M Tris, pH 7.5 혹은 pH 12.5) 위에 얹고 Beckman 초원심분리기를 사용하여 SW 65 rotor, 4°C에서 50,000 rpm로 3時間(중성인 경우) 혹은 1.5時間(알카리성 경우) 遠心시킨 후 밑으로부터 0.15ml식 재료를 취하여 방사선세기를 측정하여 그 침강위치를 정하였다.

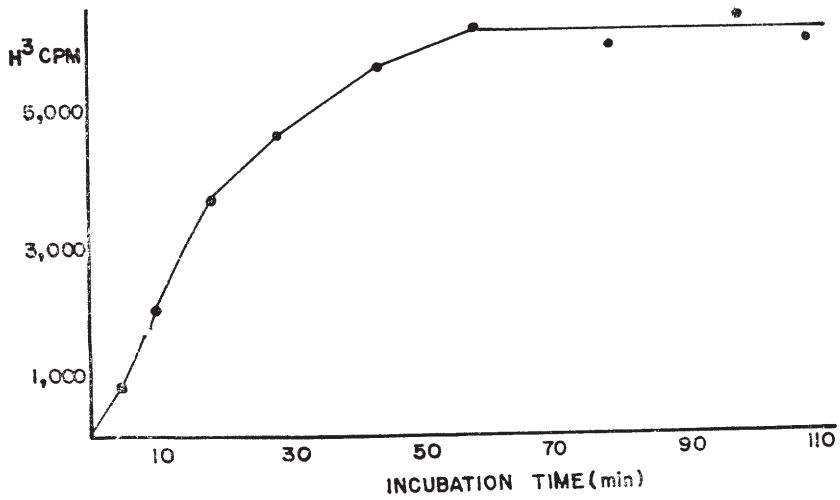
8) DNA合成酵素의 活性度 測定

試驗管內의 酵素反應溶液의 總分量은 0.2ml로서 그 構成要素와 定量은 다음과 같다. 20n mole의 dGTP, dCTP, dATP와 5n mole의 dTTP, 0.1μc의 H^3-dTTP, 0.5μ mole의 Tris buffer(pH 8.5), 2μ mole의 $MgCl_2$, 0.1M dithiotrietol (DTT)와 template로서 100μg의 活性化시킨 Salmon sperm DNA, 2~5μg의 단백질에 해당하는 DNA合成酵素을 使用하여 37°C에서 30~60分間 反應시킨 후, 10%의 trichloroacetic acid (TCA)로 沈澱시키고 Watmann GFA filter paper에 여과 시켜 얻은 filter의 放射線세기를 測定하여 DNA合成程度를 換算하였다.

結果 및 考察

먼저 材料 및 方法에서 記述한 DNA合成酵素의 活性度를 測定한 條件이 合理的인 範圍內에서 行하여졌는가를 檢討하기 爲하여 反應時間에 따른 合成酵素의 活性度를 測定하였다. Fig. 1에서와 같이 本 實驗의 條件下에서 적어도 1時間까지의 合成酵素의 活性度는 反應時間과 比例하는 範圍內에 屬함으로 妥當한 條件으로 看做하여 모든

Fig. 1. Kinetics of the DNA-polymerase reactions. The enzyme preparation used had been chromatographed on DEAE-cellulose column and further purified by glycerol gradient sedimentation. The activity of DNA polymerase was measured by the incorporation of [H^3]dTTP into an acid-insoluble products as described in Materials and Methods.



DNA合成酵素의 活性度의 測定을 本 條件에서 行하였다.

많은 量의 DNA合成酵素를 얻기 위하여 SV40 바이러스 感染 후 각 時間에 따른 DNA合成酵素의 活性度를 核部分과 細胞質部分으로 分離하여 測定하였다. 즉 바이러스 감염 후 12時間 간격으로 細胞를 수획하여 核部分과 細胞質部分으로 分離한 후 일정량의 DNA 合成酵素原으로부터 50μl의 DNA合成酵素를 재료 및 방법에서 기술한 것처럼 반응하여 活性度를 測定한 결과 核部分의 合成酵素의 活性度는 感染후 48時間에서 가장 높았으며 感染되지 않은 대조區의 DNA合成酵素의 活性度 보다 約 7~8倍 높았고, 細胞質部分의 酵素도 感染後 48時間에서 約 9倍 增加하였음을 보이고, 그 後는 酵素의 活性度가 떨어졌다. 따라서 SV40 바이러스가 誘導한 DNA合成酵素는 感染後 48時間에서 細胞를 收穫하여 準備하였다.

DNA合成酵素의 분리에 관한 실험의 결과는 준비한 DNA合成酵素原을 DEAE-cellulose column에 붓고 흡착시킨 뒤에 0.02M—0.5M KPO_4, 2mM β-mercaptoethanol, pH 7.2 완충액의 gradient로서 DNA合成酵素를 遊離精製하여 分子量을 測定하였다 (Figs. 2,3,4,5). 그림 2a,3a,4a와 5a는 DNA合成酵素의 DEAE-cellulese 交換樹脂에서 遊離되여 나오는 profile들이며 그림 2b, 3b, 4b와 5b는 각 交換樹脂에서 얻은 DNA合成酵素를 材料 및 方法에서 기술한 바 같이 각 酵素의 分子量을 測定하기 위하여 glycerol gradient로 침강 시킨 profile 들이다. DEAE-cellulose에서 遊離되는 酵素는 그림 2a와 3a에서 나타난 바와 같이 核部分의 DNA合成酵素는 0.12M~0.17M KPO_4(pH 7.2)에서 遊離되어 나온반면 細胞質 部分의 DNA合成酵素는 0.14~0.16M KPO_4 (pH 7.2)에서 遊離되였다(Figs. 4a, 5a). 이 結果에서 보면 核部分과 細胞質部分의 DNA合成酵素들이 遊離되는 완충액의 濃度에는 큰 差異가 없으나 特異한 것은 KB나 HeLa 細胞에서 發見된, 核部分에 存在하면서 0.02M KPO_4 (pH 7.2) 條件下에서는 DEAE-cellulose 交換樹脂에 附着되지 않은 合成酵素 (Weissbach et al 1971)가 원숭이 腎臟細胞에서는 發見되지 않은 點이였다. 이와 같은

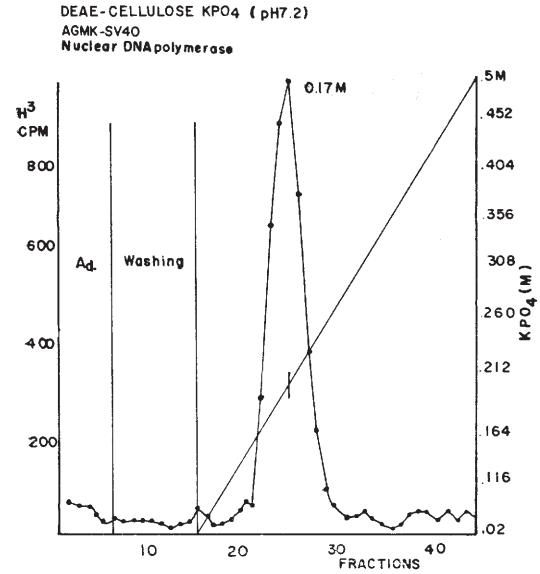


Fig. 2a. DEAE-cellulose column chromatography of nulear DNA polymerase from the AGMK cells. Nuclear fractions were prepared as in the Materials and Methods, adsorbed on a DEAE-cellulose column, and eluted with a linear, 0.02to 0.5M KPO_4 gradient(pH 7.2). Fifty microliter aliquots of each fractions (2m*l*) were assayed for DNA polymerase activity.

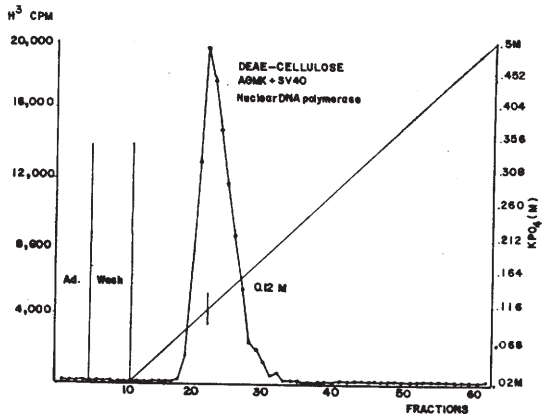


Fig. 3a. DEAE-cellulose column chromatography of nuclear DNA polymerase from the SV 40 virus infected AGMK cells.

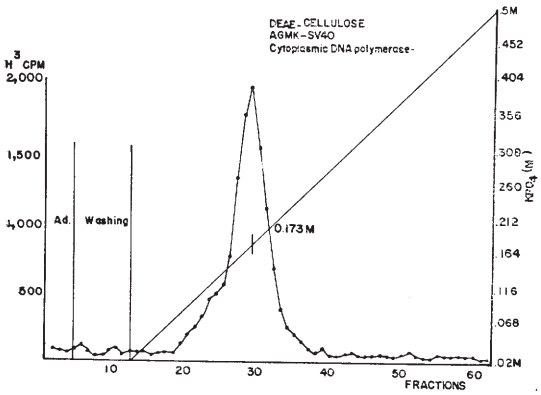


Fig. 4a. DEAE-cellulose column chromatography of cytoplasmic DNA polymerase from the AGMK cells.

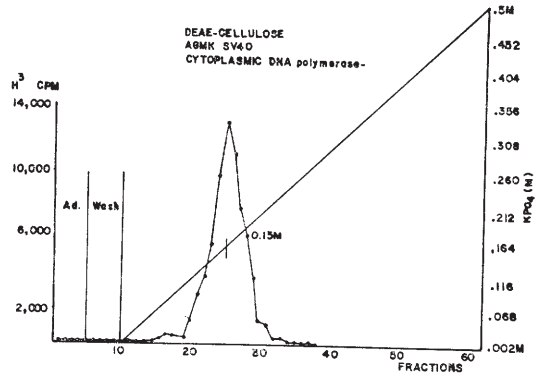


Fig. 5a. DEAE-cellulose column chromatography of cytoplasmic DNA prlymerase from the SV40 virus infected AGMK cells. Cytoplasmic fractions were prepared as in the Materials and Methods and chromatographed as Figs. 2a and 3a.

결과는 生物의 種에 따라서 DNA合成酵素의 種類와 細胞內의 位置가 다른 것을 意味한다.

DNA合成酵素의 分子量을 測定한 결과는 다음과 같다. 즉, SV40 바이러스의 感染에 의하여 誘導된 DNA合成酵素와 感染되지 않은 細胞로부터 추출한 DNA合成酵素의 分子量을 材料 및 方法에서 기술한 方法대로 測定하였다. 核部分의 DNA合成酵素는 分子量의 基準으로 보면 分子量이 큰 DNA合成酵素(8.5s)와 分子量이 적은 酵素(3.2s)의 두가지 種類를 가지고 있으나 (Figs. 2b, 3b) DEAE-cellulose 交換樹脂에 다같이 附着하여 同一한 완충액농도에서 遊

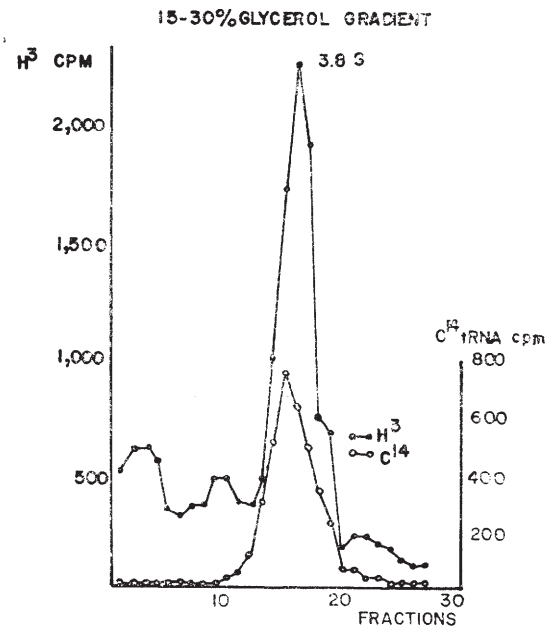


Fig. 2b. Glycerol density gradient profiles of nulear DNA polymerase from the main activity of DNA polymerase fractions of Fig. 2a. The major activity of DNA polymerase was low molecular weight but high molecular DNA polymerase was insignificant.

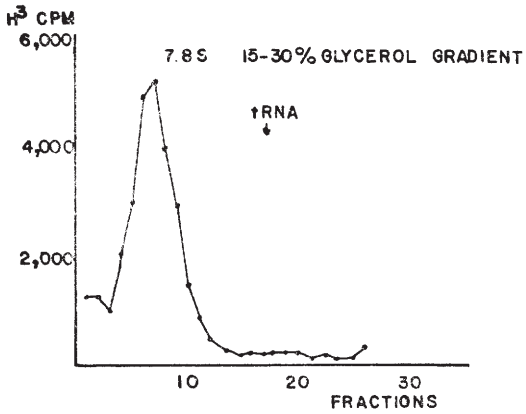


Fig. 4b. Glycerol density gradient profiles of cytoplasmic DNA polymerase from the main activity of DNA polymerase fractions of Fig. 4a. Only high mohewlar weight DNA polymerasly was found.

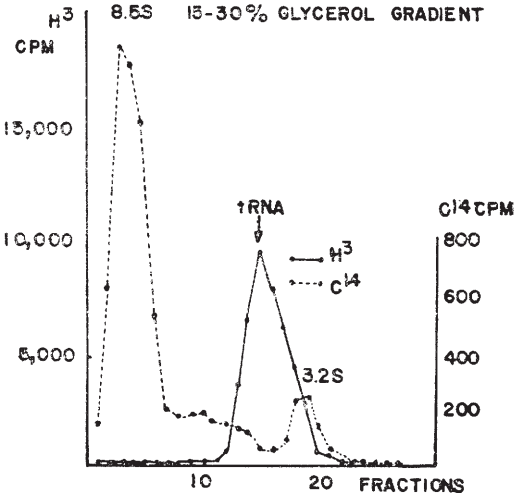


Fig. 3b. Glycerol density gradient profiles of nuclear DNA polymearse from the main activity of DNA polymerase. High molecular weight DNA polymerase was induced many fold by SV40 infection. But low molecular weight DNA polymerese was rather constant after SV40 virus infection.

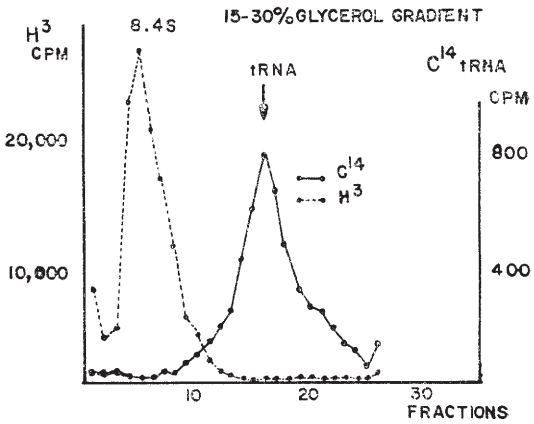


Fig. 5b. Glycerol density gradient profiles of cytoplasmic DNA polymerase from the main activity of DNA polymerase fractions of Fig. 5a. High molewlar weight DNA polymerase was induced by SV40 infection. The low molecular weight DNA polymerase was not observed in cytoplasm fractions.

離되었다(Fig. 2a, 3a). 그리고 細胞質 DNA 合成酵素는 한種類로 分子量이 큰 酵素(8.4s)만 發見되었다(Figs. 4b, 5b). 또한 SV40 바이러스가 感染하지 않은 核部分의 DNA合成酵素는 낮은 活性度의, 分子量

이 적은 酵素(3.2s)가 뚜렷하게 存在하고 分子量이 큰 酵素(8.5s)는 거의 無視할 程度의 낮은 活性度를 나타내고 있다(Fig.2b). 이에 반하여 SV40 바이러스가 感染한 細胞는 核部分과 細胞質部分의 경우 모두 分子量이 큰 酵素가 많이 誘導되나 核部分의 分子量이 적은 酵素는 감염되지 않은 細胞群과 같은 一定한 낮은 活性度를 나타내었다(Figs. 2b, 3b, 4b, 5b).

이와같은 結果는 다른 種에서 이미 報告된 바와 같이(Chang et al., 1972b, 1973; Chiu et al., 1972) 分子量이 적은 酵素의 活性度는 細胞內의 存在 位置와는 關係없이 細胞의 生活史를 통하여 一定하다는 것을 다시 확인한 것이다. 그리고 SV40 감염에 의한 分子量이 큰 DNA合成酵素의 活性度의 증가는 宿主 細胞의 DNA合成이나 SV40바이러스 自身의 DNA合成에 分子量이 큰 酵素가 관여한다는 것을 强力하게 示唆한다고 사료되며 최근에 polyoma 바이러스의 쥐세포 감염 후에도 分子量이 큰 DNA合成酵素의 活性度가 分子量이 적은 酵素보다 월등히 증가한다는 사실이 보고 되였다(Närkhammar et al., 1976). 이들 分子量이 서로 다른 DNA合成酵素의 特性에 대한 硏究를 보면 分子量이 큰 DNA合成酵素에 높은 鹽의 濃度를 處理하면 分子量이 적은 DNA合成酵素로 轉換된다는 것(Hecht, 1973a)과 細胞의 生活史에 따라서 두 種類의 DNA合成酵素의 사이에 相互轉換이 일어난다는 報告가 있었다(Hecht, 1973b). 여러가지 濃度의 ammonium sulfate나 NaCl를 分子量이 큰 酵素에 處理한 후, glycerol gradient로 分子量을 分析한 結果 分子量의 變化가 전혀 없었다. 그리고 disulfide bonds를 破壞하는 物質 N-ethylmaleimide (NEM)의 濃度가 두가지 酵素의 活性度에 대한 영향을 비교하기 위하여 각기 다른 농도의 NEM을 처리한 후 효소의 활성도를 보았다(Fig. 6). 分子量이 큰 酵素가 NEM농도에 훨씬 敏感하여 酵素活性의 沮害를 받았다. 이와 같은 결과는 分子量이 큰 DNA合成酵素가 分子量이 적은 酵素보다 더 많은 disulfide bond를 가지고 있다는 것을 의미한다. 그리고 核部分에 存在하는 分子量이 큰 酵素와 적은 酵素의 鹽類濃度에 대한 酵素活

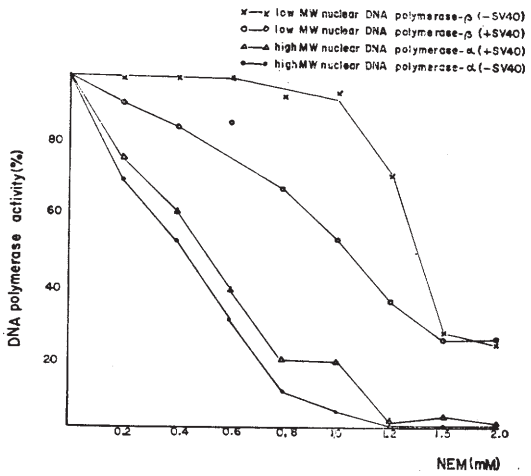


Fig. 6. Response of high and low molecular DNA polymerases to concentration of N-ethylmaleimide (NEM). DNA polymerases were prepared as described in Materials and Methods, passed through a preparative DEAE-cellulose column, centrifuged and assayed in standard conditions for 60min at 37°C. The enzyme activity in standard conditions without NEM was considered as 100%.

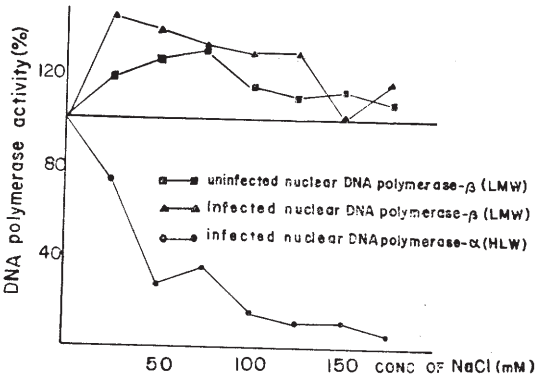


Fig. 7. Effects of NaCl concentrations on the activity of DNA polymerases. Low molecular weight DNA polymerases were activated but high molecular weight DNA polypmerase was inactivated.

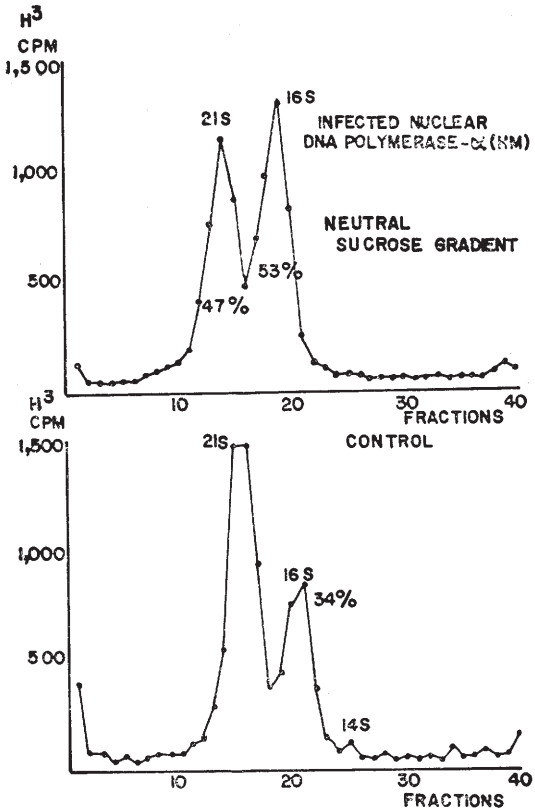
Table 1. Characteristics of DNA polymerases from the SV40 virus infected or uninfected AGMK cells.

SV 40 Virus Infection	DNA-polymerase	M.W.	NEM Sensitivity	pH optimal	Enzyme Induction	Salt effect on activity(50mM)
No	Nuclear DNA polymerase-α	7-8S	very sensitive	8.5		—
No	Nuclear DNA polymerase-β	3-4S	not very sensitive	8.5		Activation
No	Nucleoplasmic DNA polymerase-α	6-7S	very sensitive	—		—
No	Cytoplasmic DNA polymerase-α	7-8S	very sensitive	8		Inhibition
Yes	Nuclear DNA polymerase-α	7-8S	very sensitive	8.5	Yes	Inhibition
Yes	Nuclear DNA polymerase-β	3-4S	not very sensitive	8.5	No	Activation
Yes	Nucleoplasmic DNA polymerase-α	7-8S	very sensitive	—	Yes	—
Yes	Cytoplasmic DNA polymerase-α	7-8S	very sensitive	8	Yes	Inhibition

—;not checked

性度를 검토한 결과(Fig. 7) 分子量이 적은 酵素는 100mM의 NaCl농도 내에서 活性度가 증가하였고, 반면 分子量이 큰 효소는 80% 이상의 活性度가 저해를 받았다. 이와같이 효소활성도에 있어 서로 다른 영향을 받는 원인은 설명할 수 없으나 分子量이 큰 효소와 적은 효소는 구조적 특성이 다른 효소인 것을 말해 주는 것이라 하겠다. SV 40바이러스가 유도한 합성효소와 細胞가 가지고 있는 효소의 일반적인 특성 분석을 비교한 결과가 표1에 나타나 있다.

DNA合成酵素의 deoxyriboendonuclease 活性度를 분석해 본 결과는 다음과 같이 정리된다. SV40 DNA는 끝이 없는 circle로서 엿처럼 꼬여있는 狀態이다. 이와같은 DNA가 復製하기 위해서는 반드시 꼬여있는 DNA가 풀어져야 하고 DNA上의 일정한 位置에서 DNA復製가 始作된다는 것이 알려져 있다. 이와같이 特定된 場所에서 DNA復製가 일어나기 위해서는 特定한 DNA部分을 識別하고 끊어줄 수 있는 endonuclease 효소가 獨立的으로 存在하던가 혹은 DNA合成酵素 自體가 그와 같은 endonuclease activity를 가지고 있으면 더욱 유리하리라고 생각되는 것이다. SV40 DNA I을 基質로 純粹分離한 核部分과 細胞質部分의 DNA合成酵素를 各各 反應하여 endonuclease의 活性度를 測定하였다. 그림 8과 9에서 보는 바와 같이 SV40 바이러스가 感染되지 않은 경우나 SV40가 誘導한 分子量이 큰 DNA合成酵素에는 적어도 두 個의 DNA strand 中에 어느 하나를 끊어 주는 endonuclease activity가 있고 核部分의 分子量이 적은 효소는 DNA上의 어느 곳이나 끊어주는 endonuclease activity가 旺盛하였다. 따라서 endonuclease의 活性度가 制限되어 있는 分子量이 큰 DNA合成酵素가 DNA復製에 關與할 수 있는 可能性을 더욱 크게 하나, 끊은 部分이 特定한 곳인가를 究明한 후에 結論을 내릴 수 있으리라고 생각된다.



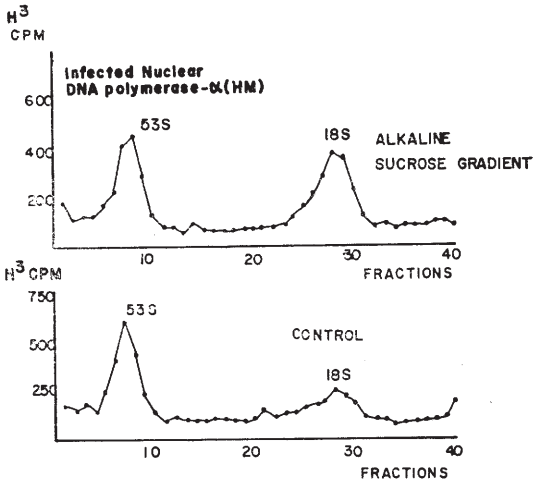


Fig. 9. Endonuclease assay of nuclear DNA polymeruse-α. Products were prepared as deseribed in Fig. 8 and analysed on alkaline sucrose gradient (pH 12.5) centrifugation. 19% conversion products was sedimented as 18s on alkaline sucrose gradient. This result suggent that the endonuclease might cut at one site on SV40-DNA-I.

Fig. 8. Endonuclease assay of nuclear DNA polymerase-α. 2μg of DNA polymerase was incubated for 60 min at 37°C in a 0.2ml mixture containing 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.02M $MgCl_2$, and 2μg of circular superhelical H^3-SV40 DNA I (8,000 cpm). The mixture was layered on 5ml gradient of 5 to 20% sucrose (pH 7.5) containing 1.0M NaCl, 0.001M EDTA, and 0.01M Tris-HCl. Conditions of centrifugation were described in Materials and Methods. About 19% of SV 40 DNA-I (21s) was converted to 16s products after treatment of DNA polymerase. This conversion was due to presense of endonuclease activity which might cut at one or more sites in single strand of SV40 DNA I (21s).

摘　　要

1) SV40바이러스가 誘導한 DNA合成酵素는 宿主細胞가 가지고 있는 DNA合成酵素와 여러가지 特徵에서 비슷하므로 SV40는 自身의 DNA復製를 위하여 宿主의 DNA合素를 變化시키지 않고 그대로 使用하는 것으로 생각된다.

2) SV40바이러스는 分子量이 큰 DNA合成酵素를 誘導하고 分子量이 적은 酵素는 誘導되지 않고 一定한 活性度를 나타내었다. 따라서 宿主의 DNA復製에나 SV40 DNA復製에는 分子量이 큰 DNA合成酵素가 關與하는 것으로 생각된다.

3) 分子量이 큰 DNA合成酵素와 分子量이 적은 DNA 合成酵素의 特性을 比較해 보면 NEM에 대한 感受性이 다르고, 鹽의 濃度에 대한 活性度가 서로 相反되는 結果를 나타내었다. 그리고 高濃度의 鹽을 處理한 후에도 分子量이 큰 酵素가 分子量이 적은 효소로의 轉換이 일어나지 않았다. 위의 結果에서 두 DNA合成酵素는 서로 다른 酵素인 것을 시사한다.

4) DNA合成酵素에 있어 endonuclease 活性度를 測定해 본 結果 分子量이 큰 DNA合成酵素에는 적어도 한 個의 DNA strand를 끊는 endonuclease 活性이 있었다. 그리고 分子量이 적은 효소는 여러곳을 끊는 endonuclease 活性을 旺盛하게 가지고 있어 獨特한 DNA位置에서 DNA復製를 始作하는 것을 必要로 하는 DNA復製現象을 참작하면 分子量이 큰 DNA合成酵素가 實際로 DNA復製에 關與하는 것으로 생각된다.

引 用 文 獻

1. Chang, L.M.S., and F. J. Bollum, 1972a. Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from rabbit bone marrow. Biochem. 11, 1264-1272.
2. Chang, L.M.S., and F.J. Bollum, 1972b. Variation of deoxyribonucleic acid polymerase activities during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 249, 7441-7446.
3. Chang, L.M.S., B. McKay, and F.J. Bollum, 1973. Induction of DNA polymerase in mouse L cell. J. Mol.Biol. 74, 1-8.
4. Chiu, J.F., and S.C.Sung, 1972. Pattern of developmental changes in two DNA polymerases of rat brain. Biochim. Biophs. Act. 269, 364-369.
5. Crawford, L.V., and P.H. Black, 1964. The nucleic acid of Simian Virus 40. Virology 24, 388-392.
6. DeLucia, P., and J. Cairns, 1969. Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224, 1164-1166.
7. Fanslor, B., and L.A.Loeb, 1972. Sea urchin nuclear DNA polymerase IV. Reversible association of DNA polymerase with nuclei during the cell cycle. Experimental cell research. 75, 433-411.
8. Fox, T,O., and A.J. Levine, 1971. Relationship between virus-induced cellular deoxyribonucleic acid synthesis and transformation by Simian Virus 40. J. Virol. 7, 473-477.
9. Gefter, M.L., Y.Hirota, J. Kornberg, J.A. Wechsler, and C. Barnoux, 1971. Analysis of DNA polymerase II and III in mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for DNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68 (12), 3156-3153.
10. Gefter, M.L, 1974. DNA polymerase II and III of *Escherichia coli*. Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol. 14, 101-116.
11. Hecht, 1973a. Interconvertibility of mouse DNA polymerase activities derived from the nucleus and cytoplasm. Biochim. Biophs. Act. 312, 471-483.
12. Hecht, 1973b. Enzymatically active intermediate in the conversion between the low and high molecular weight DNA polymerases. Nature New Biology 245, 199-201.
13. Knippers, R., 1970. DNA polymerase II. Nature 228, 1050-1053.
14. Lehman, 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid V. Chemical composition of enzymatically synthesized deoxyribonucleic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44, 1191-1196.
15. Momparler, R.L., Ross, Mosé., and A. Rabiton, 1973. Partial purification and properties of two forms of deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus. J. Biol. Chem. 248(1), 28-293.
16. Närkhammar, M., and G. Magnusson, 1976. DNA polymerase activities induced by polyoma Virus infection of 3T3 mouse fibroblasts. J. Virol. 18, 1-6.
17. Probst, G.S., and R.R. Meyers, 1973. Subcellular localization of high and low melecular weight DNA polymerases of rat liver. Biophy. Bioch. Resear. Comm. 50, 111-117.
18. Roblin, R., E. Härle, and R. Dulbecco, 1971. Poyoma Virus proteinsI. Multiful virion components. Virology 45, 555-566.
19. Sambrook, J., H. Westphal, P.R. Srinivasan, and R. Dulbecco, 1968. The intergrated state of viral DNA in SV40 transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 60, 1288-

1295.

20. Sedwick, W.P., T.S-F. Wang, and D.Korn, 1972. Purification and properties of nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerases from human KB cells. J.Biol. Chem. 247(16), 5025-5033.

21. Tait, R.C., and D.W. Smith, 1974. Roles for *E. coli* DNA polymerase I, II, and III in DNA replication. Nature 247, 116-119.

22. Tanabe, K., T. Takahashi, 1973. Conversion of DNA polymerase extracted from rat ascites Hepatoma cell. Biophy. Bioch. Resear. Comm. 53(1), 295-301.

23. Wang, T.S.-F., W.D.Sedwick, and D. Korn, 1974. Nuclear deoxyribonucleic acid polymerase purification and properties of the homogeneous enzyme from human KB cells. J. Biol. Chem. 249(3), 841-850.

24. Wallace, P.G., D.R. Hewish, M.M Venning, and L.A. Burgoyne, 1971. Multiful forms of mammalian deoxyribonucleic acid polymerase. Bioch. J. 125, 47-54.

25. Weissbach, A., A. Schlabach, B.Fridlender, and A. Bolden, 1971. DNA polymerases from human cells. Nature New Biol. 231, 167-170.

26. Weissbach, A., D. Baltimore, F. Bollum, and D. Korn, 1975. Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases. Eur. J. Biochem. 59, 1-2.