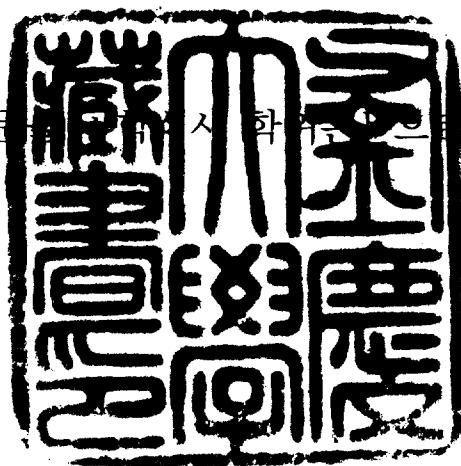


공학석사 학위논문

넙치(*Paralichthys Olivaceus*) 유래
자가복제 서열 특징분석

지도교수 이 형 호

이 논문은 부경대학교 석사학위논문으로 제출함



2002년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

최영미

최영미의 공학석사 학위논문을 인준함

2001년 12월

주 심 공학박사 김 성 구



위 원 이학박사 이 형 호



위 원 공학박사 홍 용 기



CONTENTS

List of Figure

List of Table

Abstract

I . Introduction.....1

II. Materials and methods.....10

1. Bacteria culture and condition.....	10
2. Yeast culture and condition.....	10
3. Cell line culture and condition.....	10
4. Plasmid construction.....	12
5. Plasmid preparation from <i>E.coli</i>	12
6. ExonucleaseIII digestion.....	12
7. <i>E. coli</i> transformation.....	15
8. Yeast transformation.....	15
9. Measurement of yeast transformation efficiency.....	16
10. Stability measurement of transformed plasmid.....	16
11. Total DNA preparation from yeast.....	16
12. <i>E.coli</i> back transformation.....	19
13. Cell line transfection.....	19
14. Standard curve for measurement of GFP activity	20
15. Measurement of GFP activity.....	20
16. Sequence analysis.....	20

III. Result.....	21
1. ARS1564 cloning from flounder(<i>Paralichthys Olivaceus</i>) MAR.....	21
2. ARS1564 sub-cloning by exonucleaseIII digestion.....	21
3. Characterization of sub-cloned fragment by yeast transformation.....	21
① Plasmid stability.....	21
② Yeast transformation efficiency.....	24
③ Growth rate.....	24
④ Matrix association potential.....	24
4. Characteristics of minimum ARS sequence.....	24
5. Observation plasmid of episomal state in yeast.....	28
6. ARS activity in fish cell line, CHSE-214.....	28
7. Sequence analysis.....	32
 IV. Discussion.....	 43
 V. Abstract in English.....	 54
 VI. Acknowledgement.....	 55
 VII. Reference.....	 56

List of Figure

Figure 1.	Nuclear matrix structure.....	2
Figure 2-1.	Construction of pURY19-ARS1564(MAR).....	13
Figure 2-2.	Construction of pGA-neo, ARS1564, F ₃	14
Figure 3-1.	Name, size and matrix association potential value of ARS R-series.....	22
Figure 3-2.	Name, size and matrix association potential value of ARS F-series.....	23
Figure 4.	Transformation efficiency and plasmid stability of ARS1564 sub-fragments.....	26
Figure 5.	Comparision of colony size of control YEP24 with sub-fragments of ARS1564.....	27
Figure 6.	Episomal state of transformed plasmid in yeast.....	29
Figure 7.	Measurement of GFP activity.....	30
Figure 8.	Observation of GFP activity at time course.....	31
Figure 9.	Sequences and position of sub-fragments of ARS1564.....	33
Figure 10-1.	Matrix association potential and motif of ARS1564 R-series.....	41
Figure 10-2.	Matrix association potential and motif of ARS1564 R7F-series.....	42

List of Table

Table 1. Functional properties associated with isolated nuclear matrix.....	3
Table 2. Summary of SARs/MARs identified in various cells.....	4
Table 3. Size of replicons and chromatin Loops.....	6
Table 4. Gene transfer in fish cell line.....	9
Table 5. Bacteria, yeast, cell line and plasmid DNAs.....	11
Table 6. Equation for measurement of transformation efficiency.....	17
Table 7. Equation for measurement of transformed plasmid.....	18
Table 8. Characteristics of sub-cloned fragments.....	25
Table 9. Motif patterns and its positions of ARS1564.....	37
Table 10. Motif number of ARS1564 sub-cloned fragment.....	40
Table 11. Phenotype of ACS mutation.....	45
Table 12. Comparision of sub-cloned ARS1564 with other ARSs.....	46
Table 13. Transcription factors of ARS1564.....	48

넙치(*Paralichthys Olivaceus*) 유래 자가복제 서열 특징분석

최영미

부경대학교 대학원 생물공학과

Nuclear matrix는 핵 내의 기본 골격을 구성하는 protein으로 matrix와 loop DNA와의 결합부위인 MAR(matrix attachment region) DNA와 결합하여 DNA replication, transcription, repair, splicing, recombination등의 역할을 한다.

본 실험에서는 넙치의 MAR에서 ARS(autonomously replication sequence, named ARS1564)를 cloning 하였다. ARS1564는 control vector인 YEP24에 비하여 1/3 값의 transformation efficiency를 가졌으나 exonucleaseIII deletion으로 생긴 sub-fragment 중 core sequence R7F5(192-bp)는 성장속도는 느리지만, transformation efficiency는 full인 ARS1564(7112-bp)보다 6배, YEP24보다 1.8배 높았고 R7F4(254-bp)는 성장속도도 빠르고 ARS1564(7112-bp)보다 16배, YEP24보다 4.8배 높아 강력한 ARS임을 시사했다. ARS1564를 DNASIS와 MAR finder site(<http://www.futuresoft.org/MAR-wiz>) program으로 sequence를 분석한 결과 AT 함량이 50.44%이고 일반적인 MAR, ARS의 특징인 ori, curved DNA, kinked DNA, topoII pattern, unwinding element, ACS(ARS consensus sequence), ACBP(ARS consensus binding protein)등의 motif가 존재하였다. 그러나 Fish cell line에서는 효율적인 replication origin의 기능을 하지는 못하였다.

I . Introduction

유전자의 적절한 발현에 있어서 진핵세포 내의 염색체 상에는 구조적인 부분과 기능적인 부분으로 구성되어 있어야 한다. 구조적인 부분에 대한 연구는 histone과 염색체 DNA상 간에 이루어진 loop domain 같은 염색사들의 고차원적 구조들에 대한 연구로 이미 많이 밝혀져 있다 (Gasser S. M, 1989 ; Gasser. S. M, 1987 ; Goldman M. A, 1988 ; Nelson. W. G, 1986). 이러한 유전자 발현과 관련이 있는 핵은 아주 중요한 세포 소기관으로 핵을 구조적으로 살펴보면 크게 heterochromatin과 interchromatin 즉, 유전자 발현을 하는 곳과 그렇지 않는 곳으로 분리하며, 유전자 발현을 하는 interchromatin은 euchromatin과 nonchromatin으로 분류되는데 여기서 nonchromatin을 matrix라고 한다[Fig 1]. Protein complex인 matrix를 LIS(lithium 3,5-diiodosalicylate)방법으로 분리를 하면 가장자리의 lamina protein과 가는 섬유모양의 internal matrix, 그리고 인의 잔여 물질이 남는다. Lamina protein은 핵 잔여물질 중 가장 특징지어지는 것으로 chromatin 이랑 관련이 있는 것으로 나타났는데 실제로 *in vivo*상 lamina protein 과 DNA가 binding이 된다(Gerace, 1986). 즉 이것은 chromatin loop가 matrix와 잘 접하여서 chromatin 섬유구조를 이룰 수 있게 하는 역할을 하는 것이다(Lebkowski. J. S., 1982). 이렇게 matrix상에는 5kb~200kb 까지의 다양한 loop모양 DNA가 binding되어 있는데 loop DNA중 matrix와 결합되어 있는 부분의 DNA를 특히 MAR(matrix attachment region)이라고 하며 matrix의 기능[table 1]이 직접적으로 이루어지는 곳이어서 많은 연구가 되어져 있다[table 2]. 또한 MAR와 matrix와 binding 실험으로 MAR는 진화적으로 보존이 잘 되어있는 것을 볼 수 있다. Human(Stephanie J, 1998)과 rat, chick의 matrix와 *dosophila*의 MAR와의 binding 실험(Cockerill. P. N, 1986 ; Izaurralde. E, 1988 ;

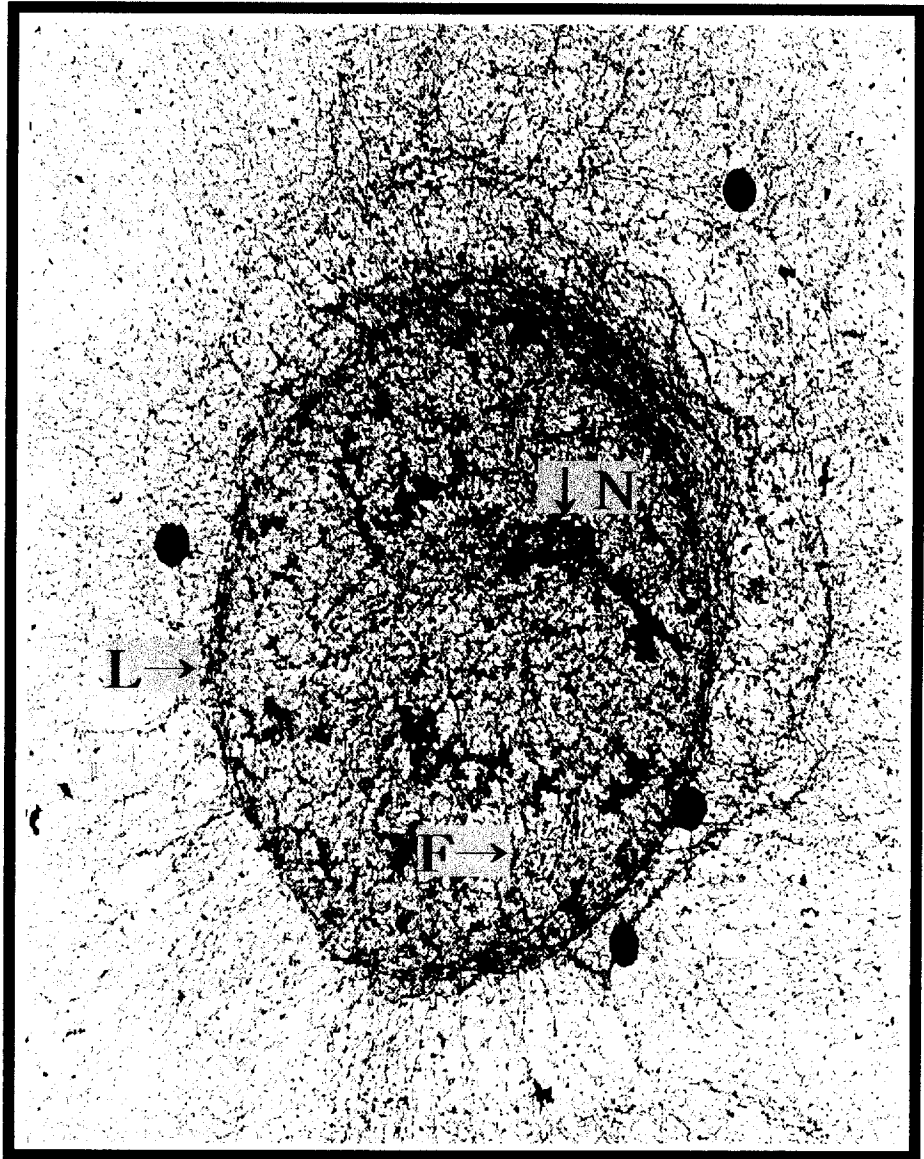


Fig 1. Nuclear matrix structure

Nuclear matrix is composed of nuclear lamina protein(L), fibrogranular internal matrix(F) and residual components of nucleoli(N)

DNA loop attschment site sequence	(Gasser and Laemmli, 1987)
DNA binding protein	(Hakes and Berezney, 1991)
DNA topoisomerase II	(Fernandes and Catapano, 1991)
Replicating DNA	(van der Velden and Wanka, 1987)
Replication origin	(Dijkwel <i>et al</i> , Tubo, 1986)
DNA polymerase α and primase	(Tubo and Berezney, 1987b)
Other replicative factors	(Tubo and Berezney, 1987a)
Active gene sequence	(Zehnbauer and Vogrlstein, 1985)
RNA polymerase II	(Lewis <i>et al</i> , 1984)
Transcriptional regulatory proteins	(Felmen and Nevins, 1983)
hn-RNA and RNP	(Verheijen <i>et al</i> , 1988)
Preribosomal RNA and RNP	(Ciejek <i>et al</i> , 1982)
sn-RNA and RNP	(Harris and Smith, 1988)
RNA splicing	(Zeitlin <i>et al</i> , 1987)
Spliceosome-associated proteins	(Blenkowe <i>et al</i> , 1994)
Steroid hormone receptor binding	(Rennie <i>et al</i> , 1983)
Viral DNA and Replication	(Smith <i>et al</i> , 1985)
Viral premessenger RNA	(Mariman <i>et al</i> , 1982)
Viral proteins	(Covey <i>et al</i> , 1984)
Carcinogen binding	(Gupta <i>et al</i> , 1985)
Oncogene proteins	(Eisenman <i>et al</i> , 1985)
Tumor suppressors	(Mancini <i>et al</i> , 1994)
Heat shock proteins	(Reter and Penman, 1983)
Calmodulin binding proteins	(Bachs and Carafoli, 1987)
HMG-14 and HMG-17 binding	(Reeves and Chang, 1983)
ADP-ribosylation	(Cardenas-Comna <i>et al</i> , 1987)
Protein phosphorylation	(Allen <i>et al</i> , 1997)
Protein kinase A	(Sikorska <i>et al</i> , 1988)
Protein kinase B	(Sahyoun <i>et al</i> , 1984)
Protein kinase C	(Capitani <i>et al</i> , 1987)
Protein kinase CK2	(Tawfic and Ahmed, 1994)
Histone acetylation and deacetylation	(Hendzel <i>et al</i> , 1991, 1994)
Protein disulfide oxidoreductase	(Altieri <i>et al</i> , 1993)
Reversible size change	(Wunderlich and Herlan, 1977)

Table 1. Functional properties associated with isolated nuclear matrix

(from 「Nuclear Matrix」, Renald Berezney et al)

Species	Gene	Position	Reference
Human	Ig κ	Intron	Whitehurst <i>et al.</i> 1992
	Apolipoprotein B	5' & 3' flank	Fortier <i>et al.</i> 1989
	γ^A	3' flank	Conningham <i>et al.</i> 1994
	Blood-clotting factor IX	5' end & intronic	Beggs <i>et al.</i> 1989
	c-myc	3' end & intron	Gromova <i>et al.</i> 1995
	β -globin gene complex	Introgenic	Higgs <i>et al.</i> 1988
	Histone H4	Promoter	Stein <i>et al.</i> 1991
	Osteocalcin	Promoter	Stein <i>et al.</i> 1991
	Topoisomerase I	Intron	Romig <i>et al.</i> 1994
Rabbit	Ig κ	intron	Sperry <i>et al.</i> 1989
Mouse	β -Globin locus	5' flank	DNA, 7, 601, 1988
Chicken	Lysozyme	5' & 3' flank	Phi-van <i>et al.</i> 1988
	α -globin	5' & 3' flank	
	β -globin	3' flank	
Xenopus	Ribosomal genes	Intergenic(OPI)	Marilley <i>et al.</i> 1989
Plant	Lectin	-7kb: Intergenic	Breyne <i>et al.</i> 1992
	Plastocyanin	3' flank	Slatter <i>et al.</i> 1991
	ST-LS1	5' & 3' flank	Dietz <i>et al.</i> 1994
	Adhl	5' flank	Paul <i>et al.</i> 1993
Drosophila	Histone	intergenic	Mirkovitch <i>et al.</i> 1984
	HSP70	intergenic	Mirkovitch <i>et al.</i> 1984
	Fishi-tarazu	5' & 3' end	Gasser <i>et al.</i> 1991
	Sgs-4	5' & 3' end	Gasser <i>et al.</i> 1988
Yeast	TRP1	ARS1	Amati <i>et al.</i> 1988
	CHR3	CEN3	
	ARS1	3' flank	

Table 2. Summary of SARs/MARs identified in various cells

(from Hak-Seob L.,1999)

Mirkovitch. J. S, 1988 ; Phi-van. L, 1988), *drosophila*의 histone gene 부분의 MAR와 yeast의 matrix와의 실험, yeast, chick cell의 matrix와 rat의 Ig κ chain gene의 MAR와의 binding(Amati. B. B, 1988 ; Cockerill. P. N, 1986 ; Phi-van. L, 1988), rat의 liver와 Hela cell, *drosophila*의 matrix와 histone, heat shock, fushi tarazu, Sgs-4, *Adh* gene상의 MAR와의 상관관계(Mirkovitch. J, in the press), soybean의 MAR와 *drosophila*의 matrix에 대한 특이성(J. Falquet, unpublished result)을 보면 종간의 matrix와 binding되는 MAR가 진화적으로 보존된 것을 알 수 있다.

이러한 MAR에 대한 연구 genomic DNA의 염색체 지도 작성으로 이어져, *Saccharomyces cerevisiae*의 MAR에서는 동원체(centromere)와 ARS(autonomously replication sequenc) element를 포함하고 있다는 것을 알았다(Amati, B. B, 1988). 또한 특이하게 *drosophila*와 mammalian matrix는 ARS1과 binding이 된다(Amati. B. B, 1988). 염색체 DNA는 독립적으로 복제 할 수 있는 단위, 즉 protein complex인 replisome과 DNA와의 복합체의 단위인 replicon(Edenberg, H. J, 1975)을 가지는데 이러한 replicon[Table 3] 내에는 스스로 복제 가능한 ARS element가 존재한다. 즉, replication이 일어나는 MAR상에는 ARS가 존재하는 것이다.

ARS는 염색체 DNA와는 독립적으로 plasmid의 존재하는 가능성으로 기초로 하여 *Saccharomyses cerevisiae*에서 알려졌다(Hsiao. C.-L, 1979 ; Stinchcomb. D. T, 1979). 그 후 plasmid상에서 *saccharomyses cerevisiae*의 replication origin으로서의 기능이 연구되었고(Brewer B. J, 1987 ; Huberman. J. A, 1987), 직접적 replicatioin DNA에 관한 실험은 plasmid상에서 ARS1과 2 μ ARS의 기능이 알려지면서 시작되었다(Huberman. J. A, 1987 ; Brewer. B. J, 1987). Replication에 있어서 ARS가 필수적임은 ARS domain을 다른 부위로 옮기거나 없애버리면 replication 기능이 저하되거나 아예 없어져 버리는 것을 볼 수 있다(Maria Gomez, 1999). 이러한 replication machinary는 진핵상에서 진화

Gene / loci	Genomic DNA size	Replicon size	Chromatin loop size	Reference
Human β -globin	3.4pg	200kb	About 8MARs over a 90kb stretch	Kitsberg <i>et al.</i> 1993
Human α -globin		>140kb		Jarman <i>et al.</i> 1988
Human INF- β			14kb	Bode <i>et al.</i> 1988
Human Apo B			47.5kb	Levy-Wilson <i>et al.</i> 1989
Human apo b(5'frank)			1.3kb	Levy-Wilson <i>et al.</i> 1989
Murine IgH	7pg	200kb	20,30,20, and >70kb	Brown <i>et al.</i> 1987
Chicken lysozyme		not known	19kb	PHI-van <i>et al.</i> 1988
Chicken α -globin (π -, α' -, α^A gene)			11.5kb	Farache <i>et al.</i> 1990a
<i>Drosophila</i> 163kb in X chromosome	0.18pg		Four loops of 75,52,15,14kb	Small <i>et al.</i> 1985
<i>Drosophila</i> 800kb in X chromosome		25replicons, 32kb average	15-115kb : weak SARs 11kb	Brun <i>et al.</i> 1990
<i>Drosophila</i> histone gene		not known	5kb	Mirkovitch <i>et al.</i> 1984
<i>Drosophila</i> Sgs-4		not known	4.7kb	Mirkovitch <i>et al.</i> 1987
<i>Drosophila</i> Adh		not known	5, 3.2kb and 4kb	Mirkovitch <i>et al.</i> 1987
<i>Drosophila</i> fiz		not known	11.1kb	Mirkovitch <i>et al.</i> 1987
<i>Drosophila</i> 320kb (rosy, Ace loci)		not known	>78, 43, 112, 26,>62kb	Mirkovitch <i>et al.</i> 1986

Total genomic(average)	Genomic DNA size	Replicon size	Chromatin loop size	Reference
Hela human	3.4pg		average 86kb	Jackson <i>et al.</i> 1990
Mouse	7pg		average 53kb	Hancock <i>et al.</i> 1982
Chinese hamster	4.2pg	30 μ m(90kb)	6.1 μ m(9.3kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
Mouse cultered ccll	7pg	45.4 μ m(136kb)	15 μ m(45kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Gallus domesticus</i>	1.4pg	63 μ m(189kb)	14.1 μ m(42kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Xenopus laevis</i>	3.0pg	57.5 μ m(172kb)	14 μ m(42bk)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Xenopus blastula</i>			9 μ m(27bk)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Xenopus neurula</i>			9-15 μ m(27-45kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Xenopus gastrula</i>			9-15 μ m(27-45kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Xenopus adult blood</i>			15 μ m(45kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.18pg	13.6 μ m(41kb)	6 μ m(18kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Drosophila</i>			85kb	Benyajati <i>et al.</i> 1976
<i>Physarum polycephalum</i>		9 μ m(27kb)	2.5-3 μ m(7.5-9kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982
<i>Pisum sativum</i>	5.8pg	54.7 μ m(164kb)	14.8 μ m(44kb)	Boungiorno-Nardelli <i>et al.</i> 1982

Table 3. Size of Replicons and Chromatin Loops (from 「Nuclear Matrix」, Renald Berezney et al)

적으로 보존되어진다(Dutta. A, 1997). 또한 ARS는 특히 ACS(ARS consensus sequence)인 A1 domain과 B1, B2, B3 domain으로 나뉘는데 (Anja-Karin Bielinsky, 1998) 특히 B3 domain은 ABF1(ARS binding factor) protein binding site가 존재한다(York Marahrens, 1992). ACS는 ARS내에 보존되는 염기서열로 「W-T-T-T-A-T-R-T-T-T-W」의 sequence를 갖고 있으며 이 중에서 「*-*-T-*-A-*-G-T-T-T-*」의 6개 base 중에서 하나라도 변형이 되면 replication 효율이 저하되거나(Robert T. Simpson, 1990) 아예 없어져 버리기도 하고(J.-H. SHON, 1996) 종간에도 보존되는 특징을 갖는다(Dutta and Bell, 1997, Rosemary K, 1997).

본 실험에서는 넙치(*Paralichthys Olivaceus*)의 MAR에서 유래한 ARS1564를 yeast상에서의 replication origin으로서의 활성을 측정한 뒤 fish cell line인 CHSE-214에 transfection 한 다음 활성도를 측정하였다. 이미 연구되어진 정보[Table 4]를 응용하여 CMV promoter와 GFP selectable report gene(Johan G. de Boer, 1997)을 사용하였다.

Specises (cell line)	Construct	Expression	Reference
Carp EPC cells	CMV-tGH CMV-lacZ $c\beta$ A-CAT RSA-bGH	Active Active Low active Active	Betancourt et al.1993 Sharps et al.1993 Moav et al.1992 Bearzotti et al.1992
Chinook salmon (CHSE-214)	CMV-LacZ	Active	Sharps et al.1993
Salmonoid cell line	AFP-CAT	Active	Jun et al.1992
Rainbow trout hepatoma cell (RTH149)	$c\beta$ A-CAT	Low active	Moav et al.1992
Rainbow trout fibroblasts(RTG2)	$c\beta$ A-CAT	Low active	Moav et al.1992
GR cell line	α g-CAT	Active	Fu et al.1993
Salmon CHSE cell	CMV-tGH RSV-tGH	Active Active	Betancourt et al.1993 Betancourt et al.1993
Tilapia To sub(2) cells	CMV-tGH RSV-tGH	Active Active	Betancourt et al.1993 Betancourt et al.1993

Table 4. Gene transfer in fish cell line

(from Kung-Hoon H.,1997)

II. Materials and Methods

1. Bacteria culture and condition

Bacteria strain은 *E.coli* DH5 α MCR을 사용했고 Luria-Bertani(LB : 0.5% yeast extract, 1% bacto-tryptone, 1% NaCl) 배지에서 37℃ 온도로 진탕 배양하였다. 선택배지로 사용하기 위해 100 μ g/ml의 ampicillin을 첨가하여 사용했고 고체배지로 사용할 경우 2% agar를 섞어주었다. *E.coli* back transformation시 host cell로는 XL1-Blue를 사용했는데 이때 12.5 μ g/ml의 tetracyclin 을 첨가하여 사용하였다.

2. Yeast culture and condition

Yeast strain으로는 출아형 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* DBY747을 사용했고 YPD(1% yeast extract, 2% Dextrose, 2% bacto-tryptone)배지에서 30℃의 온도로 진탕 배양했다. 선택배지로는 SC-URA(0.67% yeast nitrogen base, 2% Dextrose, 0.5% ammonium sulfate, 0.05% Drop-URA)로 사용하였다. 고체배지로 사용할 경우 2%의 bacto agar를 넣어주었다.

3. Cell line culture and condition

Cell line strain으로는 fish cell line인 CHSE-214(Chinook salmon embryo)을 18℃에서 고정 배양하였다. 배지로는 MEM Eagle(Minimum Essential Medium Eagle, sigma M-1018), NaHCO₃(0.35g/ℓ), penicillin G(0.06g/ℓ), streptomycin(0.1g/ℓ)을 섞어 0.2 μ m membrane으로 filter한 뒤 10% FBS(Fetal Bovine Serum)을 섞어 사용했다. 계대 배양은 cell 이 80%정도 자랐을 때 하였는데 배지를 버리고 PBS(Phosphate Buffered Saline, NaCl(8g/ℓ), KCl(0.2g/ℓ), Na₂HPO₄(1.15g/ℓ), KH₂PO₄(0.28g/ℓ))으로 2번 washing하고 Trypsine-EDTA(KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄, glucose, trypsin, EDTA)를 5분간 처리하여 30%정도 seeding 한 후 배지 10ml을 더 넣어 18℃에서 배양하였다.

	Specises	Description
Strain	E.coli DH5 α MCR	supE44, Δ lac, Δ U169, Φ 80lacZ Δ M15,hsdR17, rec A1, end A1, gry A 96, thi-1, relA1
	E.coli XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac
	S.cerevisiae DBY747	Mat a, his 3, leu2-3, lue2-112, ura3-52, trp 1-289
	CHSE-214	Chinook Salmon Embryo
Plasmid	YIP5(5541bp)	amp ^r , ter ^r , Ura ⁺ , colE1 ori
	pUC19(2686bp)	amp ^r , lacI, lacZ, colE1 ori
	pBluescript II SK(+) (2961bp)	amp ^r , F1(+)ori, colE1 ori, lacI, lacZ, T ₇ and T ₃ promoter, MCS
	YEP24(7769bp)	amp ^r , 2 μ circle ori, Ura3, Tet ^r
	pEGFP-C ₁	CMV(Cytomegalo virus) promoter, GFP. MCS, fl ori, kan ^r , SV40 polyA, pUC ori, HSV TK polyA

Table 5. Bacteria, yeast, cell line and plasmid DNAs

[Table 5]

4. Plasmid construction

*E.coli*와 yeast 간 shuttle vector인 pURY19M은 본 실험실에서 YIP5, pUC19, pBluescript II SK(+)를 이용하여 제작한 vector이다. Control vector로는 YEP24를 사용하였고 cell line에 transfection되는 pGA-neo vector도 본 실험실에서 pEGFP-C1(clontech, #6084-1)와 pUC19을 이용하여 제작한 vector이다. [Fig 2]

5. Plasmid preparation from *E.coli*

선택배지(LB-ampicillin)에 colony를 접종하여 overnight 진탕 배양한 후 1.5ml tube에서 centrifuge로 cell harvest한 뒤 200 μ l resuspension buffer(50mM Tris pH8.0, 10mM EDTA)을 넣고 vortex했다. 200 μ l lysis beffer(200mM NaOH, 1%SDS)를 넣고 invert 한 뒤 200 μ l neutralization beffer(3.0M potassium acetate pH5.5 with acetic acid)를 첨가하여 35분간 실온에서 원심분리 한 후 200 μ l silica(sigma S5631)에 상층액을 첨가했다. Washing buffer(50mM NaCl, 10mM Tris pH7.5, 2.5mM EDTA, 50% ethanol)로 washing 후 알콜을 완전히 제거한 후 35 μ l water로 elution해서 0.7% agarose gel 상에서 확인하였다.

6. ExonucleaseIII digestion

5'에서 3'방향으로 nuclease 성질을 가진 exonucleaseIII의 일정 간격의 digestion을 통해 단계적 deletion 된 sub-clone들 중 복제 원점을 갖는 최소 길이의 core sequence를 찾기 위한 단계였다. Deletion 할 방향이 5'-overhang이 되도록 제한효소로 double reaction 한 후 1분 30초 간격으로 30℃에서 exonucleaseIII 처리를 한 2.5 μ l를 미리 만들어 두었던 S1 nuclease mixture 7.5 μ l와 섞어 실온에서 30분 둔 뒤 S1 nuclease stop buffer를 넣고 70℃에서 heating하여 S1 nuclease inactivation시켰다, 알콜 침전 후 klenow polymerase와 dNTP를 각각

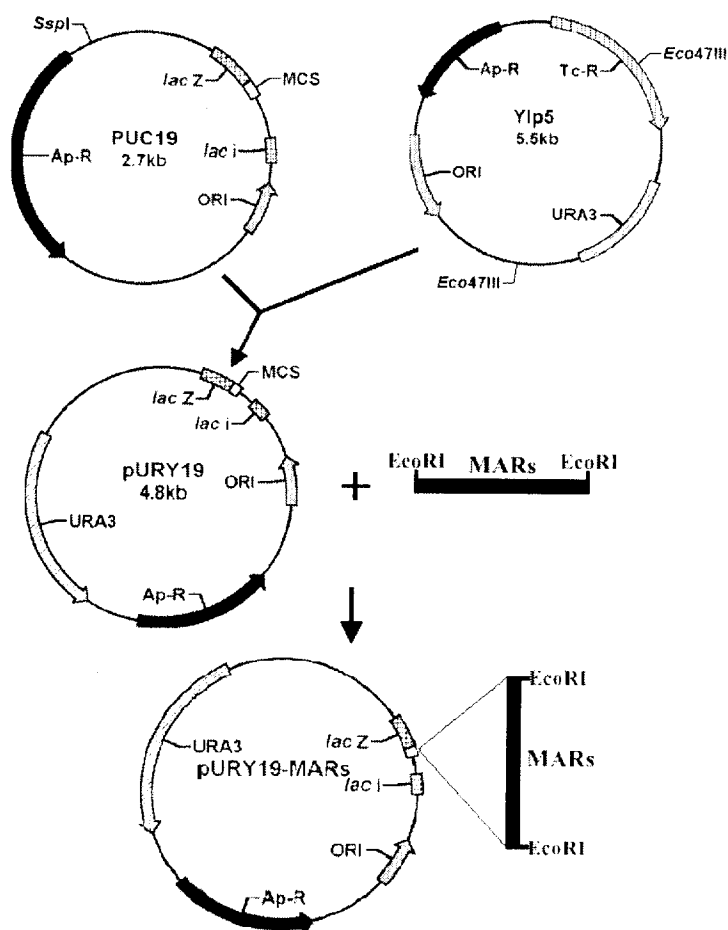


Fig 2-1. Construction of pURY19 -ARS1564(MAR)

pURY19M was constructed using pUC19, YIP5. *Eco47III* fragment(778~2908) including *URA3* selectable marker gene of YIP5 intruded into *SspI* site of pUC19. This vector named pURY19. The *pvuII* fragment(529~977) including MCS of pBluescript II SK(+) was inserted into *pvuII* site of pURY19(pURY19M). ARS1564 was inserted into *EcoRI* site of pURY19M.

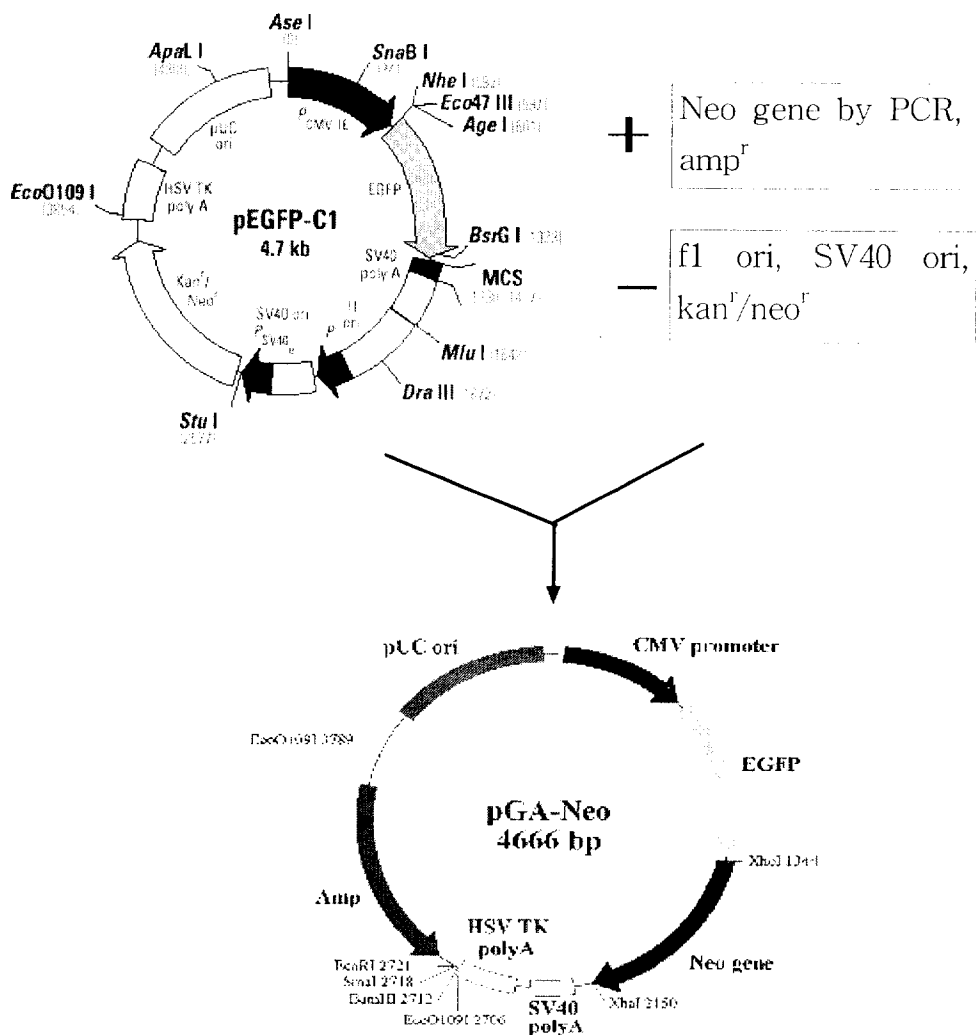


Fig2-2. Construction of pGA-neo, pGA-nARS1564, F₃

Xho I/Xba I -deleted pEGFP C1 was ligated with Neo^r selectable marker gene, and deleted fl ori, SV 40 ori, kan^r gene and added amp^r gene. The vector named pGA-neo, pGA-nARS1564, F₃ were constructed by inserting ARS1564 and F₃ into pGA-neo.

1 μ l 첨가하여 37℃에서 반응시키고 다시 65℃에서 heating하여 klenow polymerase를 inactivation 시킨 후 ligation하여 16℃에서 overnight incubation 시켰다.

7. *E. coli* transformation

LB배지에 DH5 α MCR을 37℃에서 하루 배양한 뒤 1/100로 희석된 비율로 SOB(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄)에서 OD₆₀₀값이 0.6이 되도록 18℃에서 진탕 배양시켰다. O.D값이 맞춰진 cell을 ice에 10분 둔 뒤 4℃에서 2500 \times g, 10분간 원심분리 한 후 TB buffer(10mM Pipes, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl)로 pellet을 풀어주고 ice에 10분 두었다. 4℃에서 2500 \times g, 10분간 원심분리 후 20ml의 ice cold TB buffer로 pellet을 풀고 ice에 10분 둔 뒤 1~2ml aliquot해서 -70℃에서 냉동 보관하여 사용하였다. 이렇게 CaCl₂ 처리된 competent cell 200 μ l에 DNA 0.1~50ng을 섞어 ice에 30분 뒤 42℃ 30초간 heat shock 처리 후 ice에 2분간 두고 0.8 μ l LB를 넣고 37℃에서 한시간 진탕 배양하였다. 배양한 200 μ l cell을 선택배지 plate에 도말 후 37℃에서 하루 incubation 시켰다.

8. Yeast transformation

YPD 배지에서 DBY747을 30℃에서 하루 배양한 뒤 1/10로 희석된 비율로 접종하여 다시 YPD에 O.D₆₀₀값이 1.2가 되도록 진탕 배양하였다. 4℃에서 5000rpm으로 5분간 원심분리하여 cell harvest 한 뒤 YPD 10ml, 1M Hepes 200 μ l, 1M DTT 250 μ l로 resuspension하여 30℃에서 shaking incubator에서 50~60rpm으로 15분간 배양하였다. 멸균된 2차 water를 이용한 washing은 4℃에서 5000rpm으로 5분간 2차례의 원심분리로 하였다. 마지막으로 1M sorbitol 10ml로 suspension 하여 4℃에서 8000rpm 10분간 원심분리 한 후 1M sorbitol로 cell이 3.5 \times 10⁹cell/ml되도록 suspension 해 주었다. 이렇게 만들어진 competent

cell 40 μ l와 100ng의 DNA를 섞어서 0.1cm gap cuvette에 넣은 후 ice에 15분간 두고 나서 electroporation(LV mode, pulse length : 15, set charge voltage : 325, number of pulse : 1, BTX)을 하였다. Pulse 후 바로 1M sorbitol 1ml로 안정화 한 뒤 200 μ l를 선택 고체배지에 도말하여 3~5일간 배양하였다.

9. Measurement of yeast transformation efficiency

형질 전환 효율은 DNA μ g당 C.F.U(Colony Formation Unit) 단위를 사용하였고 YEP24의 DNA μ g당 C.F.U를 기준으로 한 상대적 백분율 값으로 나타내었다.[Table 6]

10. Stability measurement of transformed plasmid

형질 전환 된 plasmid가 cell 내에 얼마나 안정하게 존재하는지를 백분율 값으로 나타내었다. Yeast transformed colony를 선택 배지(SC-URA)에 접종하여 24시간(8 generation) 동안 30℃에서 진탕 배양을 한 뒤 각각 고체 선택 배지와 비선택 배지(YPD)에 도말하였다. 이때 도말하기 전 cell counting하여 1×10^4 cell/ml 정도로 맞추어 다시 비선택 배지에 접종하여 22시간(13~14 generation)동안 30℃에서 진탕 배양 한 후 역시 각각 고체 선택배지, 비선택 배지에 도말하였다. 여기서 나온 colony 수로 generation 당 stability를 계산하였다[Table 7](Kaiser C, 1994).

11. Total DNA preparation from yeast

Transformed colony를 선택 배지에서 1주일 정도 진탕 배양 한 후 5000rpm, 5분간 원심분리하여 cell harvest 하고 100 μ l STET(8% sucrose, 50mM Tris pH8.0, 50mM EDTA, 5% Triton X-100)와 0.45mm glass beads 0.2g을 넣고 5분간 vortex 하였다. STET 100 μ l를 더 넣고 살짝 vortex, 3분간 끓인 후 4℃에서 12000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액 100 μ l에 7.5M ammonium acetate 50 μ l 넣고 -20℃에 1

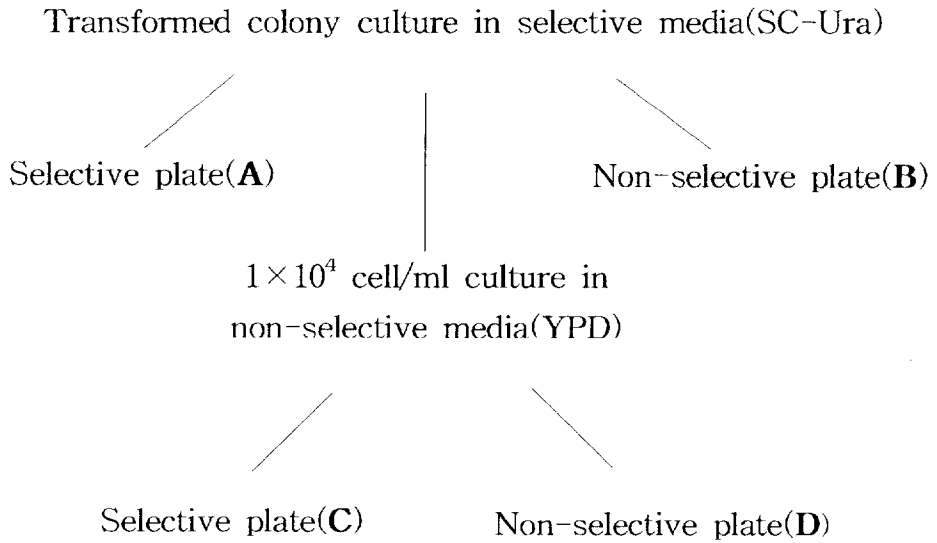
© C.F.U. (Colony Formation Unit) per μg DNA

$$\Rightarrow \frac{\text{(Number of colony on plate / pg of transformed DNA)} \times (1 \times 10 \text{ pg}/\mu\text{g})}{\text{Percent of total transformation plated}}$$

© Transformation Efficiency (%)

$$\Rightarrow \frac{\text{Sample C.F.U. per } \mu\text{g DNA(average)}}{\text{YEP24 C.F.U. per } \mu\text{g DNA(100)}} \times 100(\%)$$

Table 6. Equation for measurement of transformation efficiency



• **E** : Transformed colony number on non-selective plate

◎ Content of first plasmid (**F**) = **A** / **B**

◎ Content of Last plasmid (**L**) = **C** / **D**

◎ Generation (n) = $\log (\mathbf{D}/\mathbf{E}) / \log 2$ (**E** $\times 2^n$ = **D**)

● Plasmid Stability = $(\mathbf{F} / \mathbf{L})^{1/n} \times 100 (\%)$

Table 7. Equation for measurement of transformed plasmid

시간 두었다. 1시간 뒤 4℃에서 12000rpm, 10분간 원심분리 후 상층액 100 μ l에 200 μ l ice cold ethanol을 넣고 4℃에서 15000rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액 버리고 70% ethanol 500 μ l로 invert 후 4℃에서 15000rpm, 10분간 원심분리 하였다. 알콜 완전 제거 후 20 μ l water로 elution 하였다.

12. *E.coli* back transformation

Yeast total DNA에 transformation 된 plasmid의 episomal 상태로의 존재 여부를 확인하기 위하여 electroporation을 이용한 *E.coli* back transformation을 하였다. Host cell인 XL1-Blue를 12.5 μ g/ml의 tetracyclin이 있는 LB배지 500ml에서 O.D₆₀₀값이 0.7이 될 때까지 진탕 배양 한 후 500ml cold water로 4℃에서 3000rpm, 10분간 2차례의 원심 분리로 washing 한 후 10% glycerol이 포함된 증류수 1ml로 resuspension 하여 -70℃에 보관 사용하였다. 이렇게 만들어진 competent cell 50 μ l와 cell의 1 μ l당 0.1ng의 DNA를 섞어 얼음에 15분간 둔 뒤 0.1cm gap cuvette에 넣어 electroporation(HV mode, set voltage : 2.0kV, set pulse length : 99 μ sec set number of pulse : 10, BTX)을 하였다. Pulse 후 SOC(SOB + filtered 20mM glucose) 배지 1ml 넣고 37℃에서 1시간 진탕 배양하고 나서 선택 배지에 도말하였다.

13. Cell line transfection

Fish cell line CHSE-214가 flask 상 80%정도 자랐을 때 PBS에 washing 후 trypsin 처리하여 cell을 40ml tube에 모아 4℃에서 2000rpm, 4분간 원심분리하고 다시 한 번 PBS로 washing 후 1.5×10^7 cell/ml이 되도록 PBS를 넣고 resuspension하였다. Competent cell 400 μ l와 DNA 10 μ g을 mixing하여 0.4cm gap cuvette에 넣어 ice에 10분간 둔 후 electroporation(LV mode, pulse length : 1, set charge voltage : 350, number of pulse : 4, BTX)하였다. Pulse 후 1ml 배지로 안정화 한 후 플라스크에 넣고 배지를 더 첨가하여 24시간 지나 배지를

갈아주었다(Lee M. Ellis, 1998).

14. Standard curve for measurement of GFP activity

Expression 정도는 전체 protein 값(mg/ml)에 대한 GFP 농도를 단위 R.F.U(Realated Flourescence Unit)를 사용하여 GFP 활성을 나타내었는데 각각의 standard 값을 기준으로 그 값이 결정된다. Total protein 값은 10mg/ml로 stock된 BSA(Bovine Serum Albumin)를 점차적으로 희석시켜 1/4로 희석된 protein assay reagent(Bio-Rad, #500-0006)와 반응시킨 후 각각에 대한 OD₅₉₅값으로 나타내었다. GFP농도는 100 μ g/ μ l의 rEGFP protein(Clontech, #8365-1)을 점차적으로 희석시켜서 각각을 lysis buffer(100mM potassium phosphate pH7.8, 0.2% Triton-X, 1mM DTT)와 섞은 후 TMFluorometer에서 나타나는 exicitation filter 485~496nm, emission filter 505~515nm의 파장에서 나타나는 R.F.U로 측정하였다(Monique Bearzotti, 1992).

15. Measurement of GFP activity

측정할 flask를 PBS로 2번 washing 한 후 1ml lysis beffer를 넣고 5분간 lysis 시킨 후 1.5ml tube에 옮겨 voltax한 뒤 ice에 45분 두었다. 4℃에서 12000rpm, 5분간 원심분리 후 상층액의 200 μ l는 fluorometer에서 적당한 파장으로 R.F.U 값을 측정하고, 50 μ l의 상층액은 1/4로 희석된 protein assay reagent 2.5ml과 30분간 반응시켜 O.D₅₉₅값을 측정하였다. 여기서 나온 값으로 standard curve상에서의 protein 양(mg/ml)과 rEGFP protein 양을 결정한 뒤 total protein 값에 대한 rEGFP protein 값을 계산하였다.

16. Sequence analysis

Dideoxy-chain terminatin 방법을 수정한 williams의 방법에 따라 ABI 377 sequence에 big-dye와 M₁₃-20 primer를 이용하여 sequence를 하였다.

III. Result

1. ARS1564 cloning from flounder(*Paralichthys Olivaceus*) MAR

넙치(*Paralichthys Olivaceus*)의 matrix를 추출한 뒤 proteinase K를 처리하여 나온 MAR(Matrix Attachment Region)를 EcoR I 으로 처리한 뒤 pURY19M의 EcoR I site 내 ligation 하였다. 그 중 ARS(autonomously replication sequence)기능을 갖는 plasmid를 cloning 하기 위해 yeast 상에 형질전환을 하여 uracil이 없는 고체 선택배지(SC-URA) 상에서 selection 하는데 ARS 기능이 있으면 plasmid가 replication을 하여 uracil을 만들어 고체 선택 배지 상에서 자라게 되나, ARS기능이 없으면 자라지 못하게 되는 것이다. 이렇게 ARS기능을 갖는 clone들 중 ARS1564를 선택하게 되었다.

2. ARS1564 sub-cloning by exonucleaseIII digestion

본 실험실에서 cloning 한 MAR중 ARS를 갖는 ARS1564의 특징을 분석하기 위해 reverse 방향(R1~R8)으로 exonucleaseIII digestion을 하여 7번째 fragment(R7, 1140bp)까지 replication origin 역할을 함을 확인 한 후 R7을 다시 forward 방향(R7F1~R7F5)으로 역시 digestion 하여 ARS1564를 총 13개의 sub-fragment로 나누었다. 각 fragment의 size와 명칭은 [Fig 3]와 같다.

3. Characterization of sub-cloned fragment by yeast transformation

각각의 sub-fragment를 yeast transformation 하여 그 특성들을 살펴 보았다.

① Plasmid stability

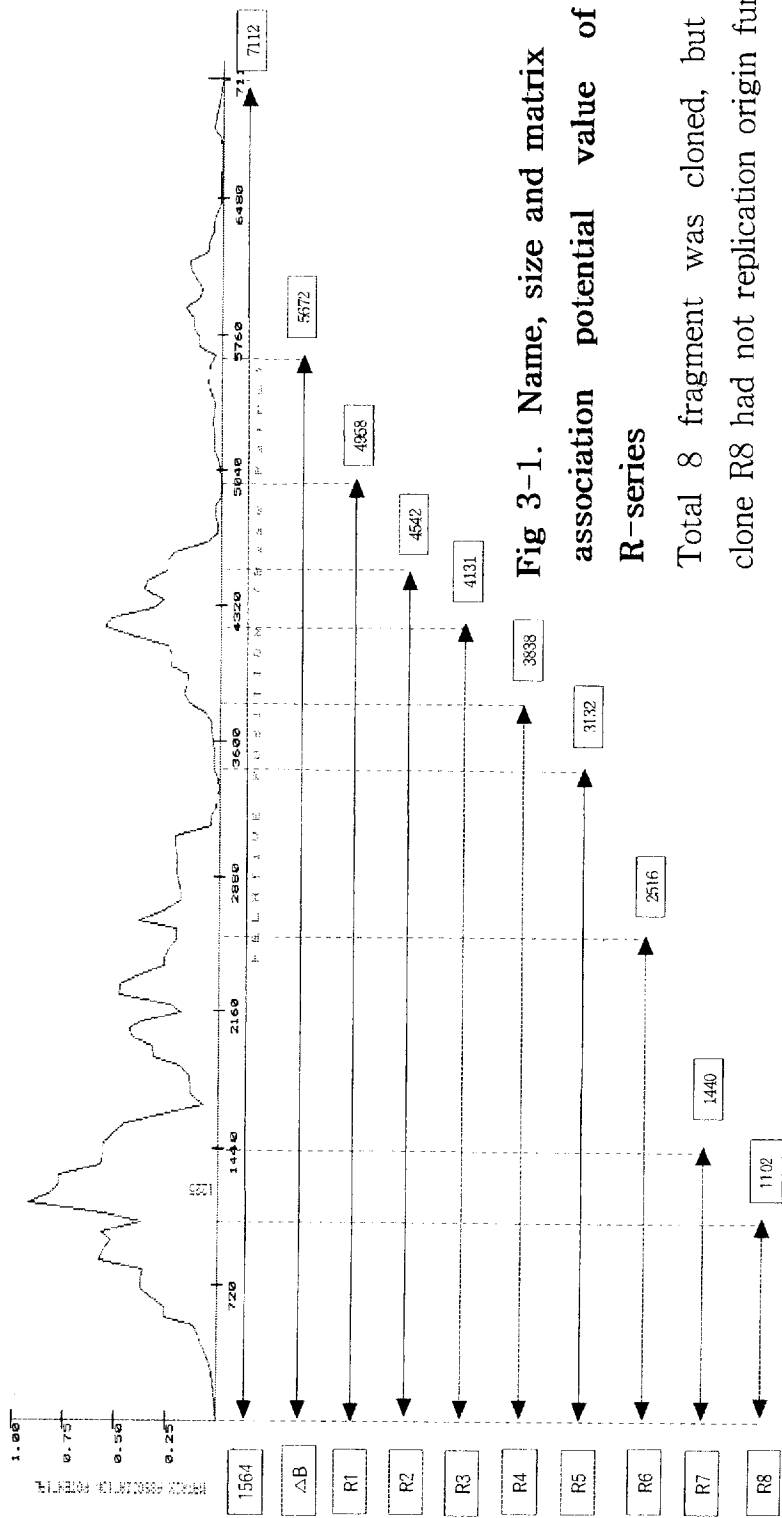


Fig 3-1. Name, size and matrix association potential value of ARS R-series

Total 8 fragment was cloned, but the last clone R8 had not replication origin function

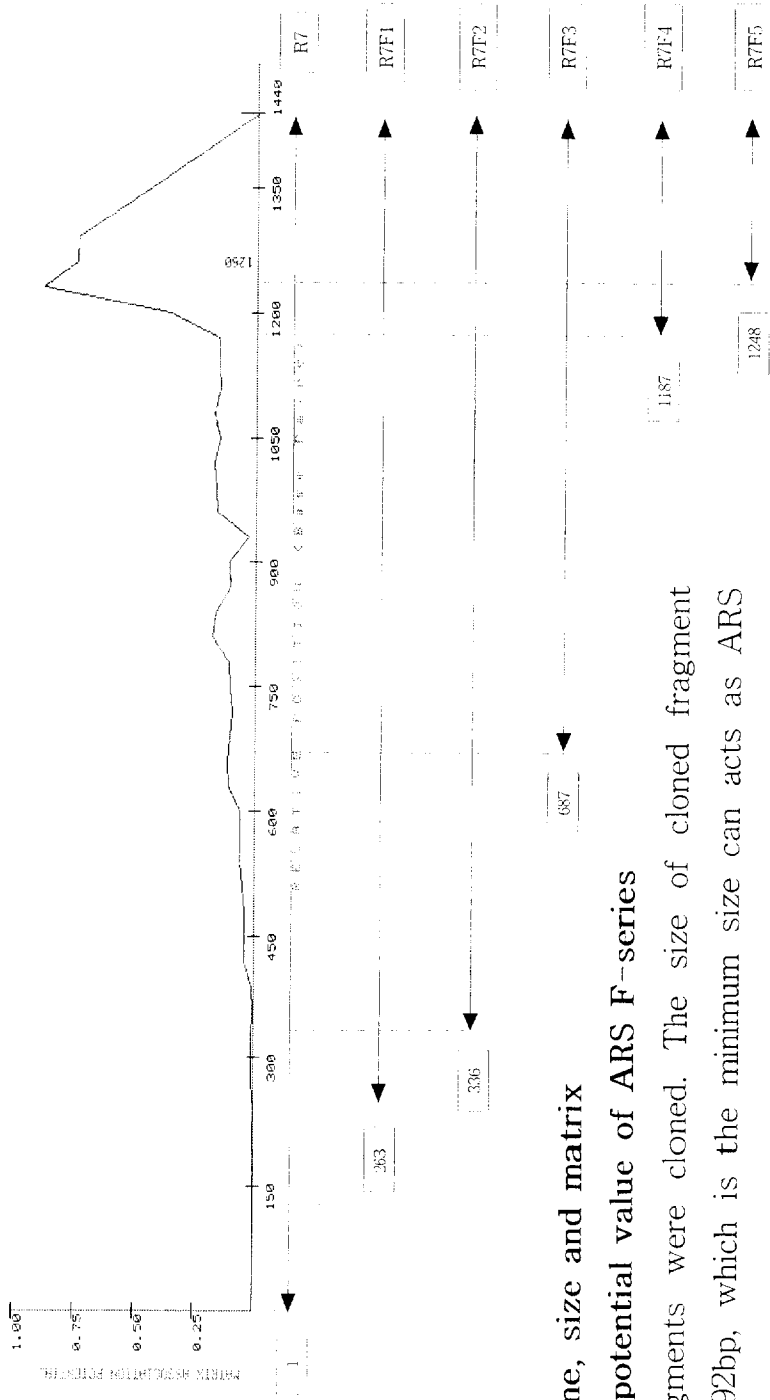


Fig 3-2. Name, size and matrix association potential value of ARS F-series

Total 5 fragments were cloned. The size of cloned fragment R7F5 was 192bp, which is the minimum size can acts as ARS function.

실험 방법에 나온 stability 측정 방법으로 한 결과 full인 ARS1564는 다소 안정성이 떨어지는 듯 보였으나 전체적으로는 stability가 비슷한 값이 나왔다. R-series는 4번 R7F-series는 3번 실험 한 평균값이고 1564는 5번, △B, R7, YEP24는 7번 실험한 값의 평균이다.

② Yeast transformation efficiency

각각의 sub-fragment의 transformation efficiency를 1 μ g DNA당 C.F.U 단위를 이용하여 YEP24를 기준으로 측정한 결과 full인 ARS1564에서는 효율이 제일 낮았지만 exonucleaseIII digestion을 한 fragment일수록 점점 높아졌다. 특히 가장 효율이 높은 R7F4는 처음 ARS1564보다 무려 16배나 높은 값을 가졌고, control인 YEP24 보다 4.8배 높은 효율을 나타냈다. 이는 ARS1564에 강력한 ARS가 존재함을 알 수 있다. R-series는 5번, R7F-series는 3번 실험한 평균값이고, 1564는 6번, △B, R7은 8번 실험한 값의 평균이다.

③ Growth rate

이는 yeast transformed colony size로 나타낼 수 있는데 [Fig 5]를 control로 각 fragment의 colony size를 표시하였다. Colony size 표시에서 L는 large, M은 middle, S는 small size를 나타낸 것이다. R7에서 R7F2까지의 growth rate가 높았다. 전체적인 sub-fragment의 특징을 [Table 8, Fig 4]에 나타내었다.

④ Matrix association potential

ARS1564가 MAR 부분임을 나타내는 것으로 <http://www.futuresoft.org/MAR-wiz> site에 sequence를 넣고 실행시켜 matrix association potential 값을 그래프로 나타내었다. R7 부분의 matrix association potential 값이 높게 나왔으며 그 중에서도 R7F4, R7F5 부분이 가장 높이 나왔다. 이것은 ARS1564 중에서도 core 부분으로 갈수록 MAR일 확률이 높은 것이다.

	Transformed plasmid stability(%)	Transformation efficiency(%)	Colony size	AT-contents (%)
1564	67.4(5)	30.6(6)	M	50.44
4B	71.6(7)	34.6(8)	M	59.8
R1	69.5	70.33	M	60.6
R2	70.5	114.02	M	61
R3	68.5	163	M	61.2
R4	71.5	99.42	M	61
R5	69.5	155.22	M	61.2
R6	73.4	256.74	M	63
R7	75.4(7)	203.33(8)	L	65.5
R7F1	74.4	222.83	L	66.3
R7F2	74.4	221.44	L	66.6
R7F3	75.4	319.17	M	66.4
R7F4	75.4	489.9	M	66.9
R7F5	74.4	182.31	S	68.6
YEP24(cont.)	77.1(7)	100	L	61.28(2 μ)

Table 8. Characteristics of sub-cloned fragments

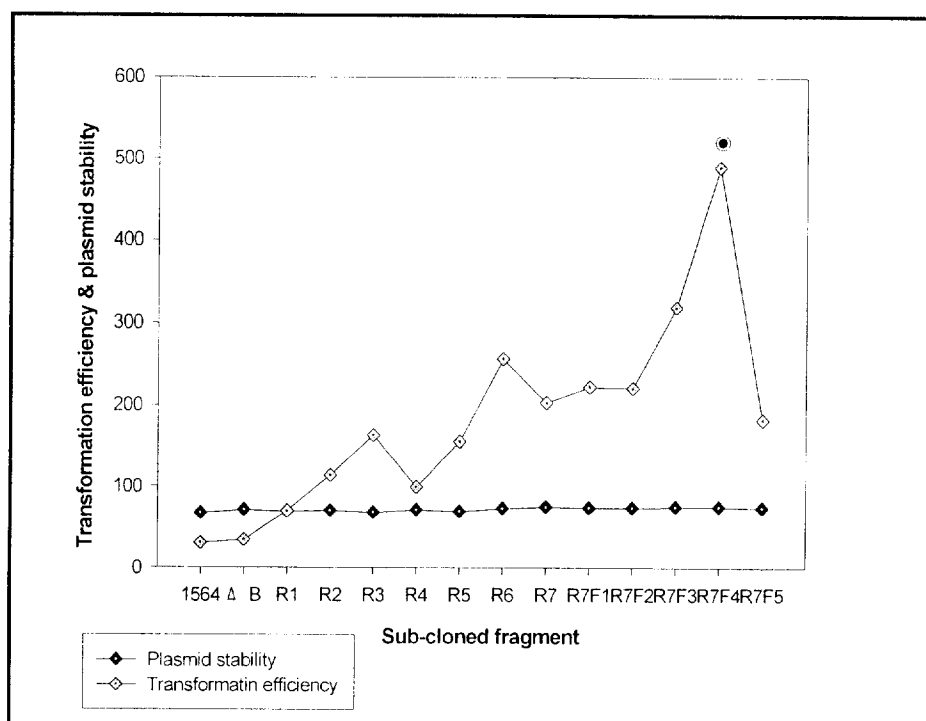


Fig 4. Transformation efficiency and plasmid stability of ARS1564 sub-fragments.

The stabilities of the transformed plasmids were stable(◆), and the transformation efficiency of sub-fragments of ARS1564 showed higher than its original clone. R7F4(●) was the highest transformation efficiency. Transformation efficiency of YEP24 was set as 100%.

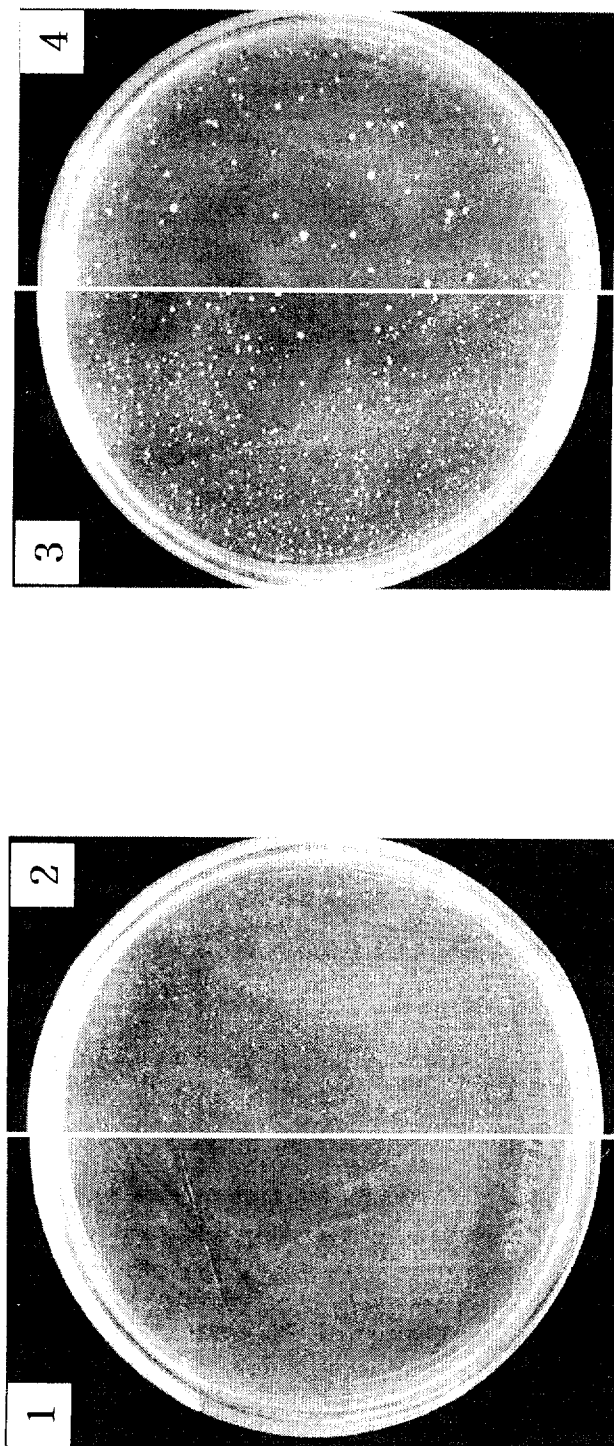


Fig 5. Comparison of colony size of control YEP24 with sub-fragments of ARS1564
1, no colony, pURY19M ; 2, small size, R7F5 ; 3, middle size, R7F4 ; 4, large size, YEP24

4. Characteristics of minimum ARS sequence

Replication origin 역할을 하는 최소 길이의 sequence로 본 실험에서는 R7F5가 core sequence에 해당된다. R7F5는 192bp이고 AT함량이 68.85%가 되며 비록 growth rate는 높지 않지만 yeast transformation efficiency가 full인 ARS1564보다 6배가 높고 control인 YEP24 보다 1.8 배 높게 왔으므로 replication origin 역할을 하고 있는 ARS라는 것을 보여준다. 무엇보다도 ACS(ARS Consensus Sequence)가 R7F5에 포함되어 있고 ACBP(ARS Consensus Binding Sequence) site가 존재하며 matrix association potential 값이 이 부분에서 가장 높은 것으로 보아 MAR와 ARS와의 관계를 추측해 볼 수 있는 부분이기도 하다. R7F4는 R7F5보다 훨씬 강력한 ARS 활성을 보였다. R7F4는 254bp로 R7F5 보다 62bp밖에 차이가 나지 않는데도 R7F5보다 transformation efficiency가 가장 높아 full인 ARS1564 보다 16배, control인 YEP24모아 4.8배나 높게 나왔으며 growth rate도 R7F5보다 높았다. R7에서는 replication origin 역할을 했으나 R8에서는 그러지 못했는데 R7과 R8사이에 해당 되는 부분이 바로 R7F4와 R7F5이다.

5. Observation plasmid of episomal state in yeast

Transformed plasmid가 yeast 상에서 genomic DNA에 integration되어 ARS 기능을 하는지 독립적으로 episomal 상태로 존재하는지를 알아보기 위해 yeast 상에서 transformed DNA를 포함하는 total DNA를 추출한 뒤 electroporation을 이용하여 *E.coli* back transformation을 하여 나온 plasmid가 yeast transformation 전의 plasmid랑 같은지 비교하였다. 그 결과 AB에서부터 R7, R7F4까지 yeast 상에서 episomal 하게 존재하였다.[Fig 6]

6. ARS activity in fish cell line, CHSE-214

본 실험실에서 제작한 marker gene GFP가 포함된 pGA-neo vector

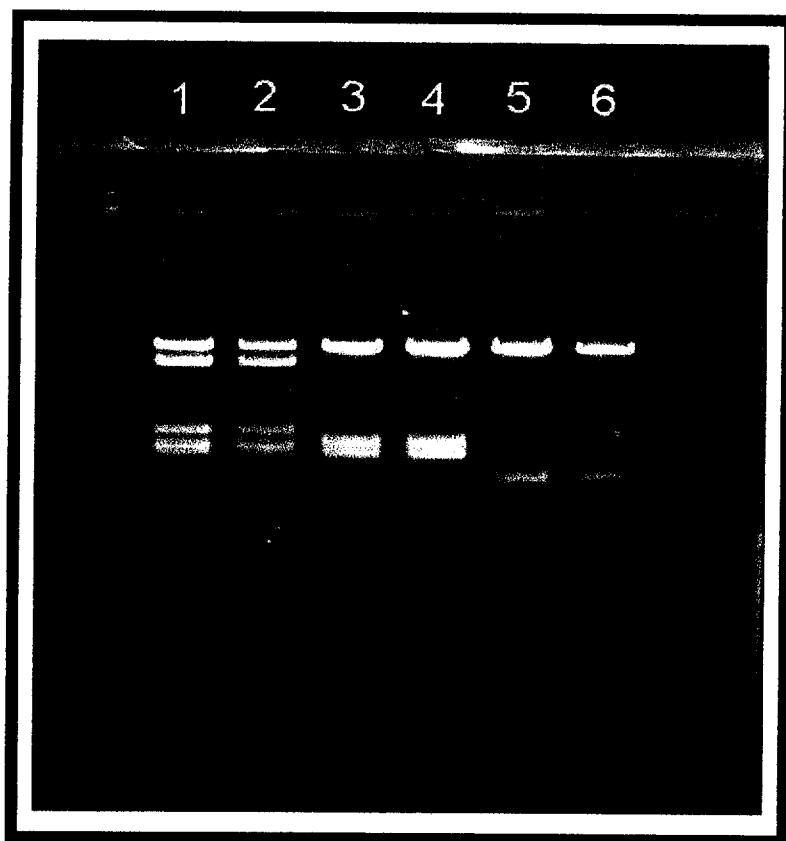


Fig 6. Episomal state of transformed plasmid in yeast

Yeast-transformed plasmid state was observed by *E.coli* back transformation with total yeast DNA and electrophoresis on 0.7% agarose gel. ΔB , R7, R7F1, R7F3, R7F4 was observed as episomal plasmid . 1, 3, 5 was intact plasmid, 2, 4, 6 was recovered plasmid by *e.coli* back trnasformation. 1, intact ΔB ; 2, recovered ΔB ; 3, intact R7 ; 4, recovered R7 ; 5, intact R7F4 ; 6, recovered R7F4

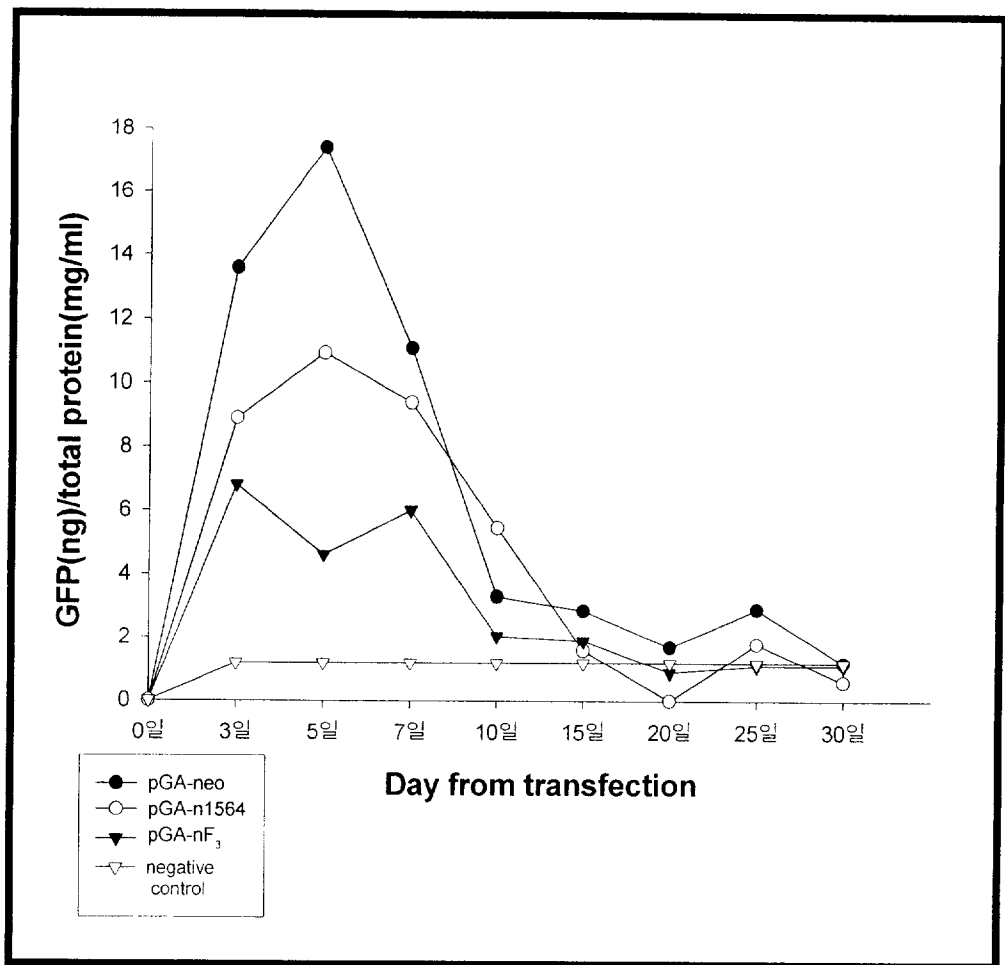


Fig 7. Measurement of GFP activity

pGA-neo, pGA-n1564, pGA-nF3 were transfected and measured GFP activity at 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 day after transfection. GFP activity indicates GFP(ng)/total protein(mg/ml).

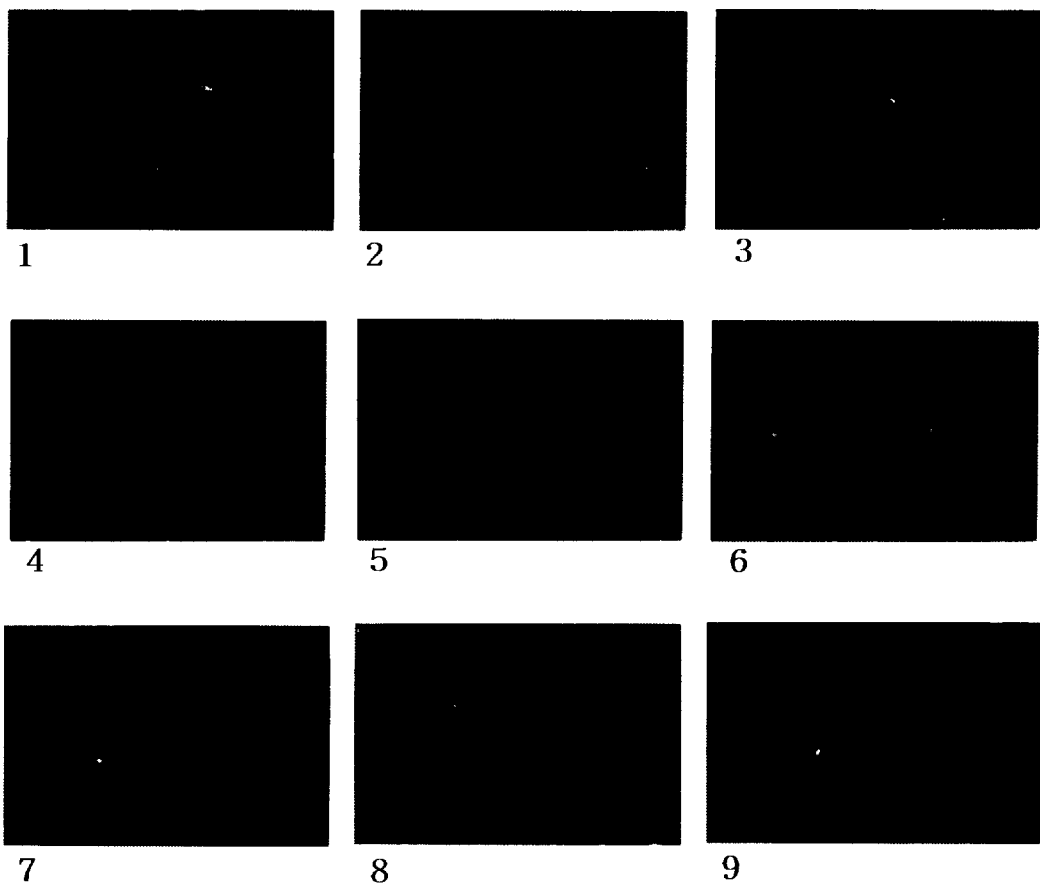


Fig 8. Observation of GFP activity at time course

Detection of GFP trnasfected pGA-neo, pGA-n1564 and pGA-nF₃ at 3, 6, 10day after transfection. **1**, 3rd day pGA-neo ; **2**, 3rd day pGA-n1564 ;

3, 3rd day pGA-nF₃ ; **4**, 6th day pGA-neo ; **5**, 6th day pGA-n1564 ;

6, 6th day pGA-nF₃ ; **7**, 10th day pGA-neo ; **8**, 10th day pGA-n1564 ;

9, 10th day pGA-nF₃

내에 full인 ARS1564(7112bp)를 EcoR I site내에, R7F3를 포함하는 fragment(1287bp)를 Sma I site 내에 ligation 하여 각각 pGA-n1564, pGA-nF₃로 transfection 할 vector를 구성하였다. Transfection 한 날로부터 3일, 5일, 7일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일까지의 GFP activity를 측정한 결과 10일까지는 확실하게 GFP activity가 존재하였다.[Fig 7] 각 일수에 대한 발현 정도를 형광 현미경으로 촬영하였다.[Fig 8]

7. Sequence analysis

ARS1564의 ExonucleaseIII digestion 한 fragment를 ABI377 sequencer에서 sequence한 결과 ARS1564는 7112bp로 구성되어 있고 AT 함량이 50.44%였다.[Fig 9] 7112bp의 염기를 <http://www.futuresoft.org/MAR-wiz>에서 분석하여 MAR motif인 ORI pattern, TG-richness pattern, curved DNA pattern(Micheal Synder, 1986), kinked DNA pattern, TopoII pattern, AT-richness pattern, ATC-rule의 위치를 확인하였고 그 외 DNASIS program으로 MRS(Matrix Recognition Sequence), flanked sequence, ARS에서의 필수 sequence인 ACS, unwinding element, ACBP등의 위치 확인하였다.[Table 9] 그리고 전체 및 sub-fragment의 motif 수를 [Table 10]에 정리하였다. 또한 MAR와 motif의 위치를 비교하기 위해 matrix association potential과 motif와의 관계를 [Fig 10]에 나타내었다.

1 GAATTCTCTCGAATCCTCTTGATTGACACTCTTCACAAGTTCAC TGGGGTAATAGCAAC
61 CATGTCTGCTCCCAGTTTGTCTCTCCCTGTTTTATATCATCCCTTGTTTGTGGGC
121 TCTGTTCACTACAAGAAAACAGATTTTAACCCACCTGAAGGCAAATAATAAAAAAGAACA
181 AGTACAATATACGTAATCAATAGATACAGTACCCACAGATTAGAAAGCCACCTGGAGTCC
241 CATTCTATTTGTCTATTGTATGAATCCAGCATCCCTAAAATACTTTGGTGTAGAAGAAA
301 GCGTTTCCTGAATGACTAATCTACTTTGTGCTGATACATTGATATGGATATCTTCA
361 CAGTAAAAACAAGGTAAATGTTTTCTTTATATTTGAGTTGCAGTGTGCCATGATTTAAAA
421 AAAAAATTCACCAGCCAATGAACCTATGAAGTGTAGACGTTAGCTAGTGTAAAAAGTTAT
481 TCATCCATCTATCCAATCAGGCAATCATGTGGCAGCAGAGCCATGTATGCAATCATGTAA
541 ACACAGGCCAGGAGTCTCAGTTAATATTTTACAGCATAGATTAAATAGCTGGTCATTAA
601 GCCTTAAGAGATTTTATACAGGATCTGAAAGACTTTTACTGATTAACAATTATATATTTT
661 GCTTTTTAATTCAGCTGAGTCTGATTAATTAAGCTTATGTTGACTACATATATTTACT
721 TATCATCTATGCCTTTTACTGTGTTTTACTTTTTCTACAGGTTTTTTTTCTATCATTCTTT
781 TTTATCTTATCCATGCTTGGGTTGCTTTCCCTGGCCATGATTGTAAGCAACTCCTGTTG
841 CTTTTAATGTGCCATATAAATAAAGTGACTTGACTCTCATACAGCCTTTAAACACAATG
901 AATGAATTAGTTTTCTTATTTATAGCCACATCTATATCTAAGTATTTTCTATCAAAAAT
961 CCCCTTTTTTACTGTAAACCAATGTCATATTGAACGCAGGGGGTCTGTTGTATAGATAATG
1021 AATCTAATCAAATGTGATTTGGGACGACTTTTGACCGATCTTATCAAATTTGACAGGTTT
1081 GATTAAAAACCCTCTCATCACCCACACCTACCCTTTTCATTGGGTAATACATCCCATTATT
1141 AAAGATAAAACAAACACGTCACTCCCTTCCCTCCTGTGAGTGTGATACATGCAGTATAG
1201 CCAAGGTCAGCCAACATGATGTAATGCAAAGCAAACCTTAAACATACTACATAAATACATG
1321 AAAATAGTTTTTTATTGGGGGGGCATAAGTGCTTTGGTGACATTTGGTAAGGCCTGTGTAT
1381 TTTATATTTTGTTTATAGTTTTAATGAAAAAAATATATAATAAAATTGAATATAAGTG
1441 CCAATAGGCTACTTTGACAGTTTCTCCAGTTGGTTCAACAAAGCAAACACCTATAGGAG
1501 AGTCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGCGGTGTGCACGCTGTTGAATCATCAAAGAGGGAA
1561 CAAAAGGCTAAAAGAAGCAGGACCAGATAAGACCGTGGCAGTAAGGAATCCAAAAGACAC
1621 TTCTGCCCACAACCTCCTCAGTCTCTATAGCAACAGCTGCTGCAGAGGCTCCGTGCAGGAG
1681 TGAGCACCCCACTGATTTTCCAACAGCTCTGTTCAACACCCGACTCACATTGGCTGGAAA
1741 CTGAAAATGACCTGTATTTCTGTCTATTCTGTCAATGAAAAGATGTGATGCCTAGAAAGTAC
1801 GGATTGTTTTCCACCTCTAAGAACAGACATTACAGACGTATTAACCTTCAACAACACAGTA
1861 ATAATAAAATTAAGACTCAGAGTCTTCAGTGAGTGATTTTTTGATGTAGATGATTAATTTT
1921 GACTTGCTTTGTGTCTAATTTATGTCTCTGACTCCTTTACTCAAACCTCACACAACACAC
1981 CCCACAATGACACATACTAAAGGCAACATTTGGCCATTGTAGCTCACCAACTTGCCAAAA
2041 GCTTAGCTGTCTCTCTCGTGCCAAACACTGGATGAAATGACTACAAGTAATGAGCATT

2101 TTAGTCCAGAAGTCTATTGTTAAAAAACCCTAAATTAAGTGTCTCAGCCTACCTTCTT
 2161 CTCTAATTGTTGCTTTTCTCTACCTCTATCCACTCTTCTTACAAGTTCTTCTGACTTGGT
 2221 ATTTAACAAGAAAAACACTCCAGCGGTGAAATAGAAGAGGCCAGAGGGAAGGAGAAGAAA
 2281 TGAGAAAAAAAAGGCCTCTTTCCATTTTGTAAATTTTTTCTAAGATGATTATAGGCTTT
 2341 GGTGCACTGAGCATTATGTGGGAGAGAAGCCCAAGAGTGTGGCAGATTGTTGAGCTGAGA
 2401 AAAGGAGTGCTTTTTCACACAAGTTGGTGCAAAAGAGTGGGGGTGCAACATGCACCAAGCA
 2461 ACTTATAGGGAAAAAAACAACCTTTATTTTAAACAACAAGCTTCTGACAAAATGTTCTAA
 2521 TGCTTGTGTGATAAATATTAATAACATCACAATAATTATTCATTCTTGTCTTGGTCTATGT
 2581 TTACCGCAACGCTTCACTGTGAAAGAGAGTAAATGCTCAGATTGTATCTGAAAGGCCCT
 2641 GTTAGCATCTATCTGTTCTGCTACATGTGGTTAACAGGGAACTTTTTGACGCTAGTGC
 2701 CCTGAGTCTGTGAAAGAGGAATCAGAGGAATGCGACCCACTCTATCAATGCCAGGGGCA
 2761 GCACCCATCCACGGCGCAGCTGTTTTGCTGAGGGCCTTGAGGCGAGAGGCCACCCCTCT
 2821 GGTGCCTCAAGGGCAGACCACCCCTGCTACTGCCCCGCAGGCCACAAGATGTCTGGCAA
 2881 GGGCACGGAACAGATGAAGGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGTGAAGAAAAGTG
 2941 TGTGTGGATTAATGCTTTTCACAGACGTGATTTTTGGACATGTCAAGTGCAAGGAGTGACG
 3001 GAAACTTAAATGCTTCAATAAGGGAAAGGACGTTAGACTTATATGTTTTCTTTTACAT
 3061 TTAAACATATGCCCATGCTGCTACGCATACATATGGCCCTATCAAAGTAGCATTATGTT
 3121 AATTAGCAGCAAAATTAAGTCAATGAACAATGTACTTGCTACATTATAAATACTCTATAT
 3181 GTCAGCGTCTTAATCATCACTGTAATTTTGATAACCCCTATGTACAGGGGTAGCCGTG
 3241 TGTCTTCATGGTGATTTTTTAGATTATCTTACAGAGGACAGTAAAGAATTAATAATCTTCT
 3301 TTATGGGTGGTAAAGGTTTCGTGAAGCTACCAGAGAGCCCCAGCACGTAATGTCTGTTCT
 3361 GTATCTTTTGTGTCATTTAGCTGGATCATGTGAGTTCAACCAGATCGGATCAGATGAAAA
 3421 ATGTGTTGTAGTGAGGGCCATGAGTGGAAGAATACATTCAAACACTCAACAGAGAATGCC
 3481 AGACCAGAAGTGATAAACTCTAAATCAACAGACAAATACCAGAGAAGAACATAGTGGTCC
 3541 GAGTAATATTTGGCGAGGACGCCCTAGCAGAGATACCCAAACGAAGAGAGGCCATATAT
 3601 AGCAGCCATTGTTGTTGTTTCTGCAGCACGCTCATTACACAAATCACCAGTGGTCAAAGG
 3661 CAATGTAAGATGTAGCATAATTGTTTCCCTGTTGATAGGCTCAAACAGAACATGCTTGT
 3721 TTGCAAAATATCCACATTATTGTCAACAGGGCGTAAGAGTCTAACAGGTCTAATGGAAGG
 3781 AGAAAAGTTACTTATTATGAATAATTGCGTGGGATTTTACTCTGTGTACTGTTTGTCTATG
 3841 GCAACCTGTACAAATCCATCAAAGTTCTTAAATTAGAATCCCACTAGTCTAGTCTGTTT
 3901 TCTTAATCTGTTGACATTTTAAATACATTCTGTCTATTGCTGTGCTGTAGCTAAAGTTTT
 3961 AGCACTACTGTACATAGTGTGACCCATTACTCATTTCTCCCTGCATGGAATGTTGTCTG
 4021 TATAAAGGACAGGGCTTGATTTTAAACATGGAATTTAAGCTGTGTGAGGCATCTCTAAAA
 4081 AAAAAAAGGAAGGAAGGAAGAAATATGCAAATATAGCACCAGGTCCCAATCCAAGT

4141 GTAAAGAATAAGGTATGTAAGTCCCTATTGGTTACCAGATGCAGGGATATGTAAGTCTAT
 4201 GAGAACCCTGCCCTCCAGGGAAAAATAGAAGTGTATTATCATCTAATTGTGGCATGCACCCAT
 4261 TTTTATTCATCTGAATTAGAATCAAAGTAAGGTTTAAATGAGTTTAAAGAAACCAACACCA
 4321 CCAATGGCAATCCTCTCCCTCTATTAAAGGCTTTCCTTTCTTTCACAGCTCTGCCTAAAAA
 4381 GGAAATGTGTGGTGGTTCCCCCTGTAAAAGGGGAAAGGGAGATGAAAAGGCTAAAGAAT
 4981 GAGGGAGGGAGGGAGGGAGAGAGAAAGGGAGACAGGGAGCCGATTCCCTTTAATGTTCCC
 5041 GGCTACAACCCATCACAAAGTCCACTCAAAGGGTTTGTAAATAATGCATGACATGCACCC
 5101 AACTAGAAAATAAGTAATGAACCTAAAGAAATAAGATCAGTGTGATTTTCATACACGCCCT
 5161 GACTTCAAAGAATCAACTTGCCTCGAGGGGGAGAAAATAGAGGGATAAAAATACATCCCA
 5221 ATGTTTTTTTTCTCTGTGAGATTGCAGACTAATTATGCCTCTGTAACACAGAGTGGGCCGG
 5281 ACAAGGCTGGATNTGANCCAGTGAATGAAGTAAAAGGAGGCCAGGGGTTATTTGGACTT
 5341 NAAGGGAAGTTTAGGCGAACATTCAAGTATGAGTCTTTATAAGTAACCTGCGGTGCCAGC
 5401 GGGAGTGTAAACAGACACTATCTGACTTTGCAAGTGCAGCGATGGAGTGCCAGTTTGAGGCG
 5461 AGGAAGCACATAATTGCTACATAATTACATGCACGAGCAGCCATTAGAATATCCGATAAA
 5521 AAAAAAGTAAAAACCAATTATGAAGGGCCGGTAATGAGGATTCAATCGACAGGGACGACG
 5581 CTGCCAGCACCAGAGACCTCCGTTCTCTCCAGTTTGACTCACATATGCTGGCCACATT
 5641 CCCCCATCTGGCAGTGGACACAAGCATGAAATGCCAGCCACTACGCAACATAATGACTT
 5701 GTGGCTATGTTCACTGTTTTTATGGTAATGGCAACCCCTTTTAACCATGCATTCTTTCACA
 5761 CCAAAGCAGGCTTCAGAGAGGGAAAAATGTATTGTGTACTTTTTATTAGCGTGACTTT
 5821 TGGGTGAAAATTGACCCCGCAAGCATTCTATCAAACCTACACCTGATGCCGGATCAAAGC
 5881 TTGGGGCTAAAGGGCAGGGAAATGGCAGATGTGCGTGGATTCTGTTCAAATTTATGCCAC
 5941 CTTGCCAGCTATTCAAGTGTTTTAAATATATCCACTAGCAATGTAATACCCACTTATCAAC
 6001 TGGGTATTGCTATCGTTTTTGGTTCACTGTGAAGTCTTTTTTTCACAAGGCCATATAAGTG
 6061 AGCCATTGCACCATTTCTCACCTCCGATTCTGACTCCCTTCCCAGCCATTTGTCCCTTTG
 6121 TTCCATATTCAAAATGTGAACCACTGAATTTGAAATCATTTCAGATCAAGGCAATGAA
 6181 TGCACCCACGAATCCATGGTGGCTGACCTCAGGAGCATATGAATAAATCAGCAGAGAGA
 6241 AAGAAAAAGAGGGTGGGGGGTGGCAGGCAAGGAGCGGACCAAACTGGATCCTTTTA
 6301 CCCCTTAGGTCTCACCGCTCCCCCAAAAATGTAATCGGCTTAACCATGGTGTGGCTGTG
 6361 GGTTCGTATTGCAAGCCAGACTGTGCCAAACAGATCCCAACAGACCAGACGGAGGCA
 6421 AAAATCAATGCCATACACCCCCGACTAATGAGATTTCTCCATTGTATTCTATGTCAAG
 6481 AGGGTGTGGGCATGTGTGTGTGTTGTGTGTGAGCGTGCAATTTGGTAAGGAGAGTGGTGG
 6541 GTGGTAAACGTCTGACATTTCTCAGCTGGGGGCATCTTGGGCATGCTCGGGGGTAGA
 6601 AAATAATGTGCGGTGCTGAGGGGATGGAAGAAGGGGGAGCTGCGAAACAGGGTATAGG
 6661 AGTGGTGGCAGGGGAGAGAAGAACAGAGAGAAAGAGAGAATGAAAAAGCCTGGAGCTCCC

6721	AACTGTGGTTGCATTGCAGATAGGTGTTATTGGAAAGGGAGTCCTCTCTCGTCTCTCTCT
6781	TTGCAGGGTTGATGTTCTCTTTAGCAAGAGCAGAGATGAATTATTAAGCTACAGAGATGG
6841	CAGCGAGAAAGCGTAAAGTAAGATGATGGGAGGTGCTAAACACGAGTGGTGAACAGGGGC
6901	TGGGAGTGCGAGAGGAAGAAAAATAAAGGATACAAAGGAACAAAACCTGTAGACAGGAGA
6961	GCACAGGAGGGGCAAGGTCTCAATGGGCTGTGTTGTAAACATACTGCTGCCCAGATATG
7021	CCTCTTTACCCCTTGGCCCTTTTAACTTCACTTTTGGGAAGCACTGGCTGAGCTACACCTGC
7081	AGGAGCTGGAATTACCTTTCAATTACTGCTGATAAATCTATGGAAGGCTTTGGGGAGACT
7141	CCACTTTTAAGCCGGCTAACAAGTCTAATTAAGTAATGAGACCCCAGGGGTAGTGAGGAG
7201	GACTTTTTTACCACTGCATTTCTCTCGTCTTTTTTTTAAATCTCTTTCTCTGAAATCGAT
7261	CTTTGATATCATAATTTTTCTGTCTTTGCACAGTCACAACAACAATCAGGGCAATACCAG
7321	CGCAACACATTGCTAGCTCGCTGAGGTCCCAGAGTCAAAAGATTTTAGCGTCAGCATGA
7381	ATATTGATGAACTCACACGTTTTCTTGGTGAATGTCCGACTCTGAGTCGGTACATGCAGT
7441	GCTTCGAGTACTGTGCAACGAGGGATATATAAAGGAAGCCTTGGCAGCAGGTCTAATGCA
7501	ACACATCATGAATAACTTAAGACAGTTTGCCAACATGGGGGCTCCTGAGGAGGCCCTTGTA
7561	ATGGTTCGGCTGCGTGCCGCAGTAAGGTCTCACCCCTGGAGAACGGACGAGCATTACCAT
7621	TCCTACGACAGCCTGCAGCTGGGTAAATAGCACGCATACGCACCACTGCAGGAGCCACTCA
7681	AATATTTACTCTTTAAATGTACAGAGAATTC

**Fig 9. Sequences and position of sub-fragments of
ARS1564(7112bp)**

Motif-1

Entry name	count	position	pattern
ORI	1 9	143-, 611-, 1319-, 2038-, 2426-, 3754- 3856-, 3979-, 6763-	A-T-T-T-T-A
	2 10	413-, 714-, 918-, 1878-, 2161-, 2999-,3315-, 3993-, 5330-, 7084-	A-T-T-T-A
	3 44	219-, 581-, 596-, 642-, 649-, 684-, 689-, 906-, 1082-, 1135-, 1138-, 1769-, 1780-, 1808-, 1852-, 2074-, 2269-, 2293-, 2477-, 2493-, 2888-, 3053-, 3062-, 3074-, 3103-, 3203-, 3228-, 3574-, 3676-, 3734-, 3813-, 3927-, 4215-, 4283-, 4651-, 4884-, 4903-, 4937-, 6220-, 6223-, 6491-, 6502-, 6568-, 7013-	A-T-T-A
Kinked DNA	1 3	3606-, 3996-, 5025-	T-A-N-N-N-T-G-N -N-N-C-A -N-N-N
	2 6	889-, 4663-, 5333-, 6396-, 6918-, 7024-	T-A-N-N-N-C-A-N -N-N-T-G-N-N-N
	3 2	1212-, 2448-	C-A-N-N-N-T-G-N -N-N-T-A-N-N-N
	4 3	93-, 1217-, 6391-	T-G-N-N-N-T-A-N -N-N-C-A-N-N-N

Motif-2

Kinked DNA	5	3	1 928-, 2082-, 3097-	T-G-N-N-N-C-A-N-N-N-T-A-N-N-N
	6	1	3601-	C-A-N-N-N-T-A-N-N-N-T-G-N-N-N
TG-rich	1		3657-	T-G-T-T-T-T-T-G
Curved DNA	8		413-, 886-, 2427-, 2999-, 3857-, 3980-, 4232-, 5359-	T-T-T-A-A-A
Topoisomerase II Recognition	20		67-, 335-, 468-, 524-, 559-, 641-, 703-, 2248-, 2470-, 2580-, 2749-, 2992-, 3389-, 3835-, 4198-, 5092-, 5358-, 5409-, 6776-, 6817-	Drosophila topoisomerase II consensus sequences
			168-, 169-, 563-, 564-, 647-, 648-, 649-, 650-, 651-, 652-, 760-, 761-, 762-, 841-, 842-, 1065-, 1321-, 1322-, 1323-, 1324-, 1338-, 1339-, 1346-, 1347-, 1348-, 1349-, 1350-, 1353-, 1354-, 1355-, 1356-, 1357-, 1358-, 1834-, 1835-, 2059-, 2060-, 2061-, 2251-, 2252-, 2253-, 2254-, 2410-, 2411-, 2412-, 2472-, 2473-, 2474-, 2475-, 2476-, 2477-, 3058-, 3059-, 3739-, 3740-, 3978-, 3979-, 4026-, 4027-, 4593-, 4606-, 4607-, 4918-, 4919-, 4920-, 5183-, 5436-, 6762-, 7079-, 7080-	
		70		
AT-rich				stretches of AT-rich sequences

ATC-rule	144	so many	stretch of 20 or more occurrences of H
MRS	2	164-, 1800-	A-A-T-A-A-Y-A-A
flanked sequence	4	388-, 653-, 711-, 1323-	T-A-T-A-T-T-T
ACS	1	1320-	W-T-T-T-A-T-R-T-T-T-W
unwinding element	6	652-, 710-, 1355-, 3535-, 5365-, 6865-	A-T-A-T-A-T
ACBP	1	1320-	W-T-T-T-A-K-R-T-T-T-W

Table 9. Motif patterns and its positions of ARS1564

Analysis of ARS1564(7112bp) by DNASIS and MAR-Finder(<http://www.futuresoft.org/MAR-wiz>) program.
MRS, matrix recognition rigion ; ACS, ARS consensus sequence ; ACBP, ARS consensus binding protein.

	1564(7112bp)	R7(1440bp)	R7F5(192bp)
ORI pattern	63	18	1
TG-Richness pattern	1	0	0
curved DNA pattern	8	2	0
kinked DNA pattern	18	4	0
topo II pattern	20	10	0
AT-rich pattern	70	32	17
ATC Rule	144	52	3
MRS	2	1	0
flanked sequence	4	4	1
ACS	1	1	1
unwinding element	6	3	1
ACBP	1	1	1

Table 10. Motif number of ARS1564 sub-cloned fragment

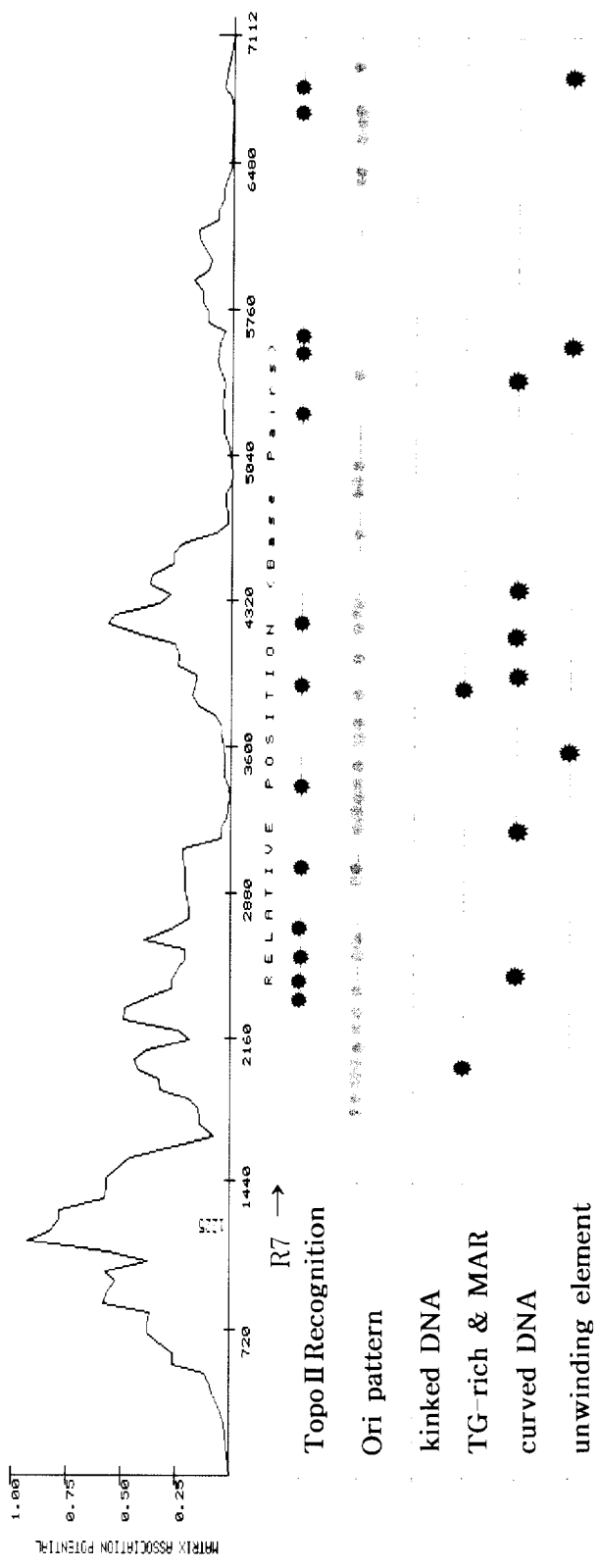


Fig 10-1. Matrix association potential and Motifs of ARS1564 R-series
 Motifs of MAR and ARS were spread on ARS 1564 R-series. Topoisomerase II recognition(●), Ori(★), kinked DNA(), MRS(Matrix Association Sequence, ●), TG-rich(●), curved DNA(●), unwinding element(●)

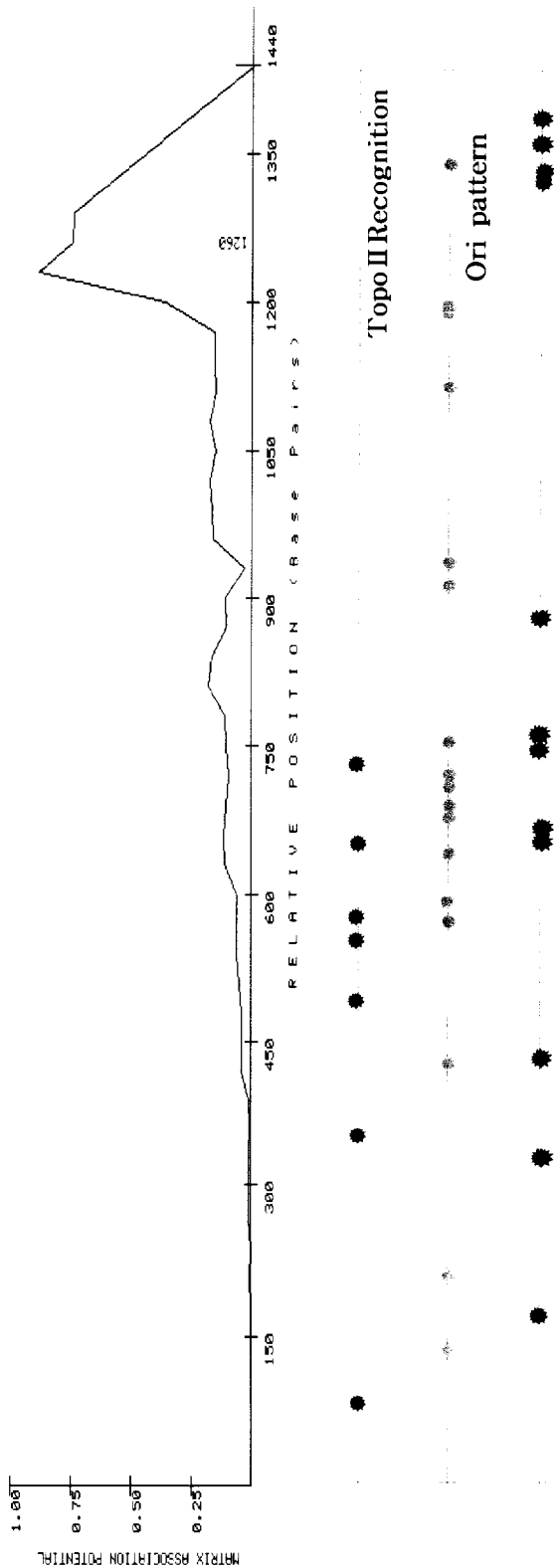


Fig 10-2. Matrix association potential and Motifs of ARS1564 R7FF-series

Motifs of MAR and ARS were spread on ARS 1564 R7F-series. Topoisomerase II recognition(●), Ori(※), kinked DNA(), MRS(Matrix Association Sequence, ●), franked sequence(●), curved DNA(●), unwinding element(●), ACS(ARS Consensus Sequence, ●), ACBP(ARS Consensus Binding Protein,●)

IV. Discussion

ARS1564는 넙치(*Paralichthys Olivaceus*) MAR로부터 유래되었기 때문에 sequence 상에서도 MAR로서의 특징이 나타난다. MAR의 sequence적인 특징으로는, 5개의 *drosophila* upstream MAR의 sequence 분석을 통해 특이한 10-bp의 A-rich sequence (AATAAATAAA)와 10-bp T-rich sequence의 다수 copy를 포함 (Gasser. S. M, 1986)하였으며 또한 non-transcription 부분(Ruth E. Kelly, 1995)이 있고, AT-rich DNA(Yukiko Okuno, 1999)가 1kb이상을 차지하고 있으며, 8개 이상의 TopoII cleavage consensus DAN element가 존재함이 밝혀졌다(Gasser. S. M, 1986). 이러한 MAR의 일반적인 특징들과 비교 해 보면 ARS1564는 우선 matrix association potential 수치가 높게 나타났고 ORI pattern이 있어 본 실험에서 연구한 것처럼 자체 replication이 가능하며, curved DNA나 kinked DNA pattern(Takashi Ohyama, 1999), flanked sequence(E. Izaurralde, 1988) 그리고 AT-rich sequence가 70여 곳이나 존재하여서 unwinding DNA 생성이 용이할 것이다. 또한 conserve된 MRS site가 존재하며 replication, transcription, recombinant등에 관여하는 topoisomeraseII recognition site가 있는데 이러한 TopoisomeraseII는 metaphase matrix의 주된 구성요소로 알려져 있으며(Maxwell P. Lee, 1989, Earnshaw. W. C, 1985), human의 metaphase matrix의 경우 DNA loop당 3copy가 존재한다(Gasser S. M, 1986). 이처럼 matrix association potential 값이나 motif 상에서 MAR로서의 특징을 나타낼 수도 있고, 직접 matrix를 추출하여 matrix랑 binding 해보는 것도 그 특징을 눈으로 직접 확인하는 방법이 될 것이다.




ARS1564의 높은 transformation efficiency를 통해 ARS1564에 강력한 ARS를 포함하고 있음을 알 수 있다. 특히 core sequence에 가까울

수록 더 높은 효율을 보이는 것은 replication origin에 필수적인 ACS와 ACBP 때문일 것이다. ACS는 잘 conserve 되어 있는데 ACS 11-bp 「W-T-T-T-A-T-R-T-T-T-W」 중 특히 3번째, 5번째, 7번째에서 10번째 「*--T-*--A-*--R-T-T-T-*」의 6개 base 중 하나라도 변형된 sequence는 replication origin 기능이 없어져서 더 이상 ACS로서의 역할을 하지 못하게 된다(J. Virginia Van Houten, 1990)[Table 11]. 본 실험에서 찾는 ACS는 11-bp가 정확히 맞아 origin replication 역할을 하는 핵심이 되는데 이는 1320-bp의 위치에 있는 ACS와 ACBP가 제거되고 나면 더 이상 replication origin 역할을 못하는 것으로 증명할 수 있다. 또한 ARS는 종간에도 conserve 된다(James F. Theis, 1999). *Saccharomyces Carlsbergensis*에서 추출한 7개의 ARS를 각각 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Saccharomyces monacensis*에 형질 전환시킨 결과 두 종에 공통적으로 완전한 replication origin을 하는 ARS는 ARS305, ARS306 이었고(Chen Yang, 1999), 7개의 ARS sequence를 찾아서 본 실험에서 사용한 ARS1564와 motif 비교를 해 보았다[Table 12]. 이중에서 완전한 replication origin 역할을 하는 ARS305, ARS306, 혹은 부분적 ARS 기능을 갖는 ARS309는 공통적으로 ACS 혹은 ACBP를 포함하고 있어 ACS 혹은 ACBP가 필수적임을 알 수 있다.

MAR로서의 ARS1564 특징을 종합해 보면 MAR로서의 특징 분석을 통해 ARS1564의 7112bp중 matrix랑 가장 관련이 있다고 추측되는 부위와 ARS의 core sequence가 일치함을 볼 수 있다. Matrix association potential 값이 가장 높은 부분 속에 ACS와 ACBP가 존재한 것이다. 따라서 MAR 상에서 ARS가 존재하여서 replication이 일어난다고 볼 수 있다. 실제로 ARS는 matrix와 binding되거나 관련이 있지만 모든 MAR는 ARS와 관련이 있는 것이 아니라 replication에 필요한 최소의 길이, double helix의 minor groove structure인 MAR ARS가 필요하다(Bruno, 1990). 최소 길이가 400bp에서 500bp으로 알려진 것에 비해 본 실험의 ARS기능을 갖는 최소 길이는 192bp으로 size가 축소되어 용이하게 취급 할 수 있는 장점을 갖는다. MAR는 matrix라는 protein과 직

	W	T	T	T	A	T	R	T	T	T	T	W
T												
A												
G												
C												

Table 11. Phenotype of ACS(W-T-T-T-A-T-G-T-T-W) mutation
 (from J. VIRGINIA VAN HOUTEN, 1990)

 was wild phenotype and  reduced replication origin activity  missed origin activity.

	ARS304	ARS305	ARS306	ARS307	ARS308	ARS309	ARS310	ARS1564-R7	ARS1564-R7F5
size(bp)	992	843	455	654	326	322	963	1440	192
AT-contents	65.22	61.79	59.02	63.75	68.51	69.24	65.72	65.47	68.58
ori	11	6	9	10	6	4	11	17	1
TG-rich	1	0	0	0	0	1	0	0	0
curved DNA	1	3	0	0	0	0	2	2	0
kinked DNA	3	0	0	1	1	0	0	4	0
topo II recognition	2	3	2	3	0	0	2	7	0
AT-richness	21	8	7	5	8	18	15	33	17
ATC rule	58	47	0	32	1	0	17	65	3
MRS	0	0	0	1	0	0	0	1	0
flanked sequence	1	0	1	0	1	1	0	4	1
ACS	0	0	1	0	0	1	0	1	1
unwinding	1	0	0	0	0	1	0	3	1
ACBP	0	1	1	0	0	1	0	1	0
Motif									

Table 12. Comparison of sub-cloned ARS1564 with other ARSs

접적으로 닿는 부분이라 matrix상에 있는 여러 기능을 갖는 protein들과 접하게 되는데 실제로 MRS와 ACBP등의 protein binding site가 존재하며 ARS1564의 이러한 replication origin으로서의 역할 외에 transcription과 관련된 MAR로서의 기능도 조사해 보았다[Table 13].

Transformed DNA는 genomic DNA내에 integration되거나 genomic DNA와는 독립적으로 episomal 상태로 존재하는데 주로 integration 되는 확률이 높지만 episomal 상태의 plasmid는 취급에 있어서 편리하므로 이미 나와 있는 연구에서도 episomal vector를 많이 사용하였다. (Tun Huang, 1995) 본 실험에서도 transformed plasmid가 episomal 상태를 확인하였다[Fig 6]. Episomal plasmid로서의 확인은 vector가 degradation되지 않고 적당한 copy수를 유지함을 알 수 있다. 그런데 transformation 전 DNA와 transformed DNA가 일치하는 것이 있는가 하면 일부 일치하지 않는 것도 있는데 일치하지 않는 것들은 sample 모두가 size가 같은 일률적인 DNA의 pattern으로 나타났다 (do not show). 또한 cell line에 transfection 된 plasmid를 total DNA 분리 및 back transformation을 통해 확인을 해 보아도 trasfection 전의 DNA와는 다르나 모두 size가 같은 일률적인 pattern을 나타내었다. 이것은 transformation 혹은 transfection 되어서 genomic DNA에 integration 되었다가 total DNA 분리 및 back transformation을 하는 동안 특정한 크기로 잘려져서 이루어진 DNA일 것이라고 추측된다. 그러면 형질전환 전의 DNA와 같은 plasmid 또한 integration 되었다가 total DNA 분리 및 back transformation 과정에서 다시 분리되어 나왔을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 혹은 일정한 size가 나옴은 일정하게 잘려지는 site를 생각해 볼 수 있는데 이것은 transposon과의 관계도 생각해 본다.

Cell line CHSE-214를 transfection 한 후 GFP expression정도를 측정해 보면 control인 pGA-neo vector보다 낮은 값을 가진다. Cell line에서는 충분한 replication origin 역할을 하지 못한 것이다. 그 이유로 우선 vector상 문제를 생각해 본다 Cell line 상 selection marker로 사용하기 위한 neo-gene이 PCR된 foreign gene으로 삽입되어서 GFP 발

Transcript.-1

Entry Name	Count	Position	Pattern
AABS_CS2	2	1, 6390-	G-T-G-N-N-G-Y- A-A
alpha_INF.2	22	863-, 1685-, 2701-, 2218-, 2341-, 2961-, 2966-, 3428-, 3964-, 4031-4236-, 4318-, 4356-, 4405-, 4540-, 4714-, 4742-, 5456-, 6155-, 6325-, 6334-, 6871-	A-A-R-K-G-A
alpha_TIF_CS	1	5847-	T-A-A-T-G-A-R- A-T
Anterior_Pit. _ES	1	2492-	A-W-W-T-A-T-N -C-A-T
AP_1_CS3	9	313-, 640-, 1080-, 1482-, 1850-, 3738-, 5016-, 5621-, 6909-	T-G-A-N-T-M-A
AP_1_CS4	2	313-, 5016- 5022	
AP_2_CS3	1	2796-, 2803	
AP_2_CS6	3	2691-, 6582-, 6583-	C-C-C-M-N-S-S- S
AP_3_CS	2	606-, 2883-	T-G-T-G-G-W-W -W
ARS_CS	1	1320-	W-T-T-T-A-Y-R- T-T-T-W-B
bHLH_CS	35	52-, 229-, 506-, 672-, 1029-, 1300-, 1407-, 1593-, 1947-, 2604-, 2717-, 2831-, 2923-, 3006-, 3031-, 3327-, 3351-, 4076-, 4116-, 4208-, 4539-, 5023-, 5045-, 5260-, 5306-, 5354-, 5397-, 5507-, 5532-, 5617-, 5891-, 5966-, 6120-, 6474-, 7036-	C-A-N-N-T-G
bicoid_CS	2	3842- 3850, 6636- 6644	B-B-T-A-A-T-C- Y-V.

Transcript. -2

CAP_site	64	so many	C-A-N-Y-Y-Y
CArg_box_CS	1	4313-	C-C-W-W-W-W-W-W-G -G
CF1_CS	6	346-, 3032-, 3986-, 5300-, 6235-, 6933-	A-N-A-T-G-G
CK_8_mer	1	1547-	A-A-N-C-C-A-A-A
CP_2_gamma_FBG	2	5077-, 7072-	A-G-C-C-A-C-T
CRE1	2	1158-, 6770-	C-G-T-C-A
CREB_CS	1	1157-	A-C-G-T-C-A
E1A_F_CS	2	968- 2974, 4688-	N-G-G-A-Y-G-T
E2A_CS	6	1592-, 2716-, 2830-, 5305-, 5965-, 7035-	R-C-A-G-N-T-G
E2BP_CS	2	2383-, 6897-	T-G-C-A-A-Y-A-Y
engrailed_CS	3	949-, 3039-, 5248-	H-C-W-A-T-H-A-A-A
Ets_1_CS	1	4860-	S-M-G-G-A-W-G-Y
FSE2.1	1	6310-	G-A-G-A-G-G-A
GAGA_CS	1	3525-	M-G-A-G-A-G-A-G-C
gamma_IRE_CS	34	18-, 207-, 232-, 334-, 385-, 409-, 549-, 595-, 619-, 869-, 972-, 1215-, 1674-, 1692-, 1895-, 2292-, 2422-, 2737-, 2938-, 3052-, 3141-, 3299-, 3573-, 3926-, 3975-, 4487-, 4687-, 5065-, 5688-, 6110-, 6424-, 6480-, 6486-, 7068-	C-W-K-K-A-N-N-Y
GATA_1_CS	9	1013-, 1143-, 1525-, 2469-, 3150-, 3431-, 3633-, 6138-, 6510-	W-G-A-T-A-R
c_Myb_CS	2	558-, 1407-	C-M-G-T-T-R
C/EBP_CS1	7	46-, 1119-, 1217-, 1302-, 5921-, 6200-, 6569-	T-K-N-N-G-Y-A-A-K
ZDNA_CS	1	1467-	G-C-G-T-G-T-G-C-A
XRE_CS1	4	1474-, 2630-, 3567-, 7050-	C-A-C-G-C-W

Transcript. -3

GMCSF_CS	27	595-, 1134-, 1300-, 1768-, 1947-, 2037-, 2243-, 2292-, 2998-, 3052-, 3102-, 3314-, 3573-, 3675-, 3855-, 3866-, 3926-, 3933-, 4198-, 4902-, 5244-, 5472-, 5507-, 5558-, 5956-, 6617-, 7012-	C-A-T-T-W
GRE_CS7	1	3293-	W-C-T-G-W-T-C -T
GRE_CS8	2	1760-6080-	A-G-A-W-C-A-G -W
H_APF_1_RS	1	1674-	C-T-G-G-R-A-A
H1_conserved_US	3	539-891-1147-	A-A-A-C-A-C-A
H2B_CCAAT	3	435-493- 4934-	C-C-A-A-T-N-A
HiNF_A_RS	1	247-	A-T-T-T-N-N-N -N-A-T-T-T
HIS4_US	14	313-, 703-, 866-, 871-, 1860-, 1889-, 2020-, 2152-, 4560-, 4822-, 5016-, 5095-, 5214-, 5491-	T-G-A-C-T
HNF_5_CS	5	110-, 246-, 254-, 3770-, 5901-	T-R-T-T-T-G-Y
HSVIE	1	5847-	T-A-A-T-G-A-R -A-T
JCV_repeated_seq	5	4383-, 4387-, 4391-, 5652-, 6034-	G-G-G-N-G-G-R- R
LBP_1_RS	12	44-, 333-, 2009-, 2758-, 2813-, 3828-, 4502-, 5047-, 5373-, 5399-, 5687-, 6461-	W-C-T-R-G
malT_CS	2	2012-6597-	G-G-A-K-G-A
NF_E1_CS2	1	1526-	G-A-T-A-A-G
NFI_CS3	1	4688-	T-G-G-N-N-N-N -N-N-G-C-C
NFI_NFI	1	433-	A-G-C-C-A-A-T
NRE_Box1_CS	1	4270-	A-N-C-C-T-C-T- C-Y

Transcript. -4

LF_A1_RS	7	3035-, 4694-, 5030-, 5232-, 5538-, 5604-, 6433-	T-G-R-M-C-C
MBF_1_CS	3	1462-, 1472-, 2628-	T-G-C-R-C-R-C
MRE_CS2	6	1462-, 1472-, 2628-, 4192-, 4494-, 5581-	T-G-C-R-C-N-C
Myb_CS	2	5397-, 6120-	Y-A-A-C-K-G
NF_E1_CS1	2	719-, 3203-	M-Y-W-A-T-C-W- Y
NF_IL6_CS	8	46-, 1119-, 1217-, 1302-, 5921-, 6200-, 6451-, 6569-	T-K-N-N-G-N-A-A -K
NF_S_CS	3	3120-, 3919-, 6770-	Y-G-T-C-A-G-C
NFI_CS6	1	4688-	Y-G-G-M-N-N-N-N -N-G-C-C
NFkB_CS1	1	3751-	G-G-G-R-H-T-Y-Y -H-C
Oct_R_CS	1	4049-	A-T-G-C-A-A-A-Y
PEA3_CS	9	2939-, 4033-, 4037-, 4041-, 4320-, 4861-, 5669-, 6313-, 6873-	A-G-G-A-A-R
Pit_1_CS1	4	477-, 787-, 2494-, 4203-	W-T-A-T-Y-C-A-T
RAD_CS	1	4859-	C-G-W-G-G-W-N- G-M-A
Sp1_CS4	2	4855-, 6296-	K-R-G-G-C-K-R-R -K
TATA_box_ CS	4	651-, 855-, 1356-, 6866-	T-A-T-A-W-A-W
TCF_2_alpha _CS	1	4860-	S-A-G-G-A-A-G-Y
uteroglobin_ HS2.4_CS	1	3256-	R-Y-Y-W-S-G-T-G
v_MCS	2	5397-6120-	Y-A-A-C-K-G
W_element_ CS	2	2397- 4142-	W-G-N-A-M-C-Y- K
ZESTE_CS	6	676-, 2643-, 4694-, 4769-, 5459-, 6823-	Y-G-A-G-Y-C

transcript. -5

CAAT Box	8	435-, 493-, 979-, 1381-, 4070-, 4261-, 4618-, 4934-	C-C-A-A-T
poly A signal	4	1270-, 2423-, 4202-, 5203-	T-T-T-A-T-T
TATA Box	3	855-, 3961-, 6868-	T-A-T-A-A-A

Table 13. Transcription factors of ARS1564

현에 방해를 받아 gene expression이 어려워졌을 것이라 예상된다. 그리고 domain 간의 충돌로 생각해 보면 insert ARS1564의 replication domain 방향과 gene transcription domain의 충돌로 인한 발현률 감소를 원인으로 생각해 볼 수 있다. 즉 size가 작은 pGA-nF₃가 발현률이 더 떨어지는 것을 보면 이러한 가설이 성립됨을 알 수 있다. ARS1564상의 문제라면 같은 eukaryote라도 종간에 replication origin으로 인지하는 부위가 다름을 예상해 볼 수 있다. 즉 yeast 상 replication origin 역할을 하는 부위와 mammalian cell에서의 replication origin 부위가 다르다고 생각하는 것이다.

핵 내의 replication, transcription 그리고 splicing 등의 기능을 담당하는 matrix와 그와 근접한 MAR는 matrix와의 상호 연관성이 있을 뿐 아니라 matrix의 기능을 수행하는데 필수적이다. 이러한 MAR의 ARS적 기능을 이용한 expression vector로서의 사용은 형질전환체 내로 들어가서도 matrix와 상호작용이 이루어져 유전자 발현에 효율적으로 이용될 수 있을 것이다.

V. Abstract in English

Characterization of ARS(Autonomously Replication Sequence) from flounder(*Paralichthys Olivaceus*) MAR(Matrix Attachment Region)

Nuclear matrix is the basic structure in Nucleus and its functions, such as DNA replication, transcription, repair, splicing and recombination. Nuclear matrix attachment regions(MARs) are specific DNAs attached to the nuclear matrix. Most of autonomously replication sequences are associated with nuclear matrix.

In this study, an ARS(named ARS1564) was isolated from MARs of flounder. The ARS1564 showed about one third of transformation efficiency of the control vector, YEP24. Identification of the essential region which are responsible for the ARS function in the ARS was made by deletion by exonucleaseIII. Interestingly, essential element of the deleted cloned, R7F5(192bp) had 6 times and 1.8times higher yeast transformation efficiency than original clone and control vector YEP24. Another clone R7F4(254bp) had 16 times and 4.8 times higher yeast transformation efficiency than original clone and YEP24. So, ARS1564 is strong ARS in yeast. The cloned ARS element was sequenced and analyzed using the DNASIS and MAR Finder(<http://www.futuresoft.org/MAR-wiz>) programs. The ARS1564 is composed of 7112 base pairs in length and AT contents of 50.44% and shows a set of common MAR characteristics, such as replication origin patterns, topoisomeraseII, kinked DNA, curved DNA, unwinding element and ACS(ARS consensus sequences). ARS1564 didn't show that the clone can efficiently replicate the plasmid in fish cell line, CHSE-214

VI. Acknowledgement

2년 동안의 생활이 정리되는 이 시점에서 그 동안의 생활을 돌이켜보면 많은 추억이 남습니다. 논문이 완성되기까지 많은 격려와 사랑으로 보살펴주신 이형호 지도교수님께 정말 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 항상 관심을 가지고 지켜보시며 격려의 말로 위로해 주신 김성구 교수님과 홍용기 교수님, 공재열 교수님, 김중균 교수님, 공인수 교수님, 박남규 교수님께도 감사드립니다.

우리의 영원한 정신적 지주이신 임학섭 박사님을 비롯하여 항상 칭찬과 충고를 아끼지 않으셨던 김무상 선배님, 알게 모르게 도움을 받으며 편안히 실험 할 수 있게 해준 지연이, 한창 실험을 배우느라 열심인 우리 실험실의 막내들 상욱이와 성준이, 2년동안 동고동락의 생활을 같이 하여 왔던 그래서 더욱 고마운 옥순이.. 너무너무 고맙다는 말은 하고 싶고 실험실원들과의 생활들은 영원히 잊혀지지 않을 것입니다.

지금은 실험실에 같이 있지 않지만 제게 많은 실험을 가르쳐주신 진영이 언니와 지연이 언니, 강은 선배, 미경이 언니, 경훈 선배에게도 감사드립니다.

옆에서 항상 힘이 되어주었던 숙현이와 지영이, 항상 격려의 말을 아끼지 않으셨던 목사님과 교회 언니, 오빠들과 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

무엇보다도 아무 부담없이 공부와 실험에 전념할 수 있게 해주신 부모님께 감사드리며 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다.

VII. Reference

- Amati, B. B., and S. M. Gasser(1988). Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the nuclear scaffold. *Cell*, 54, 967-978.
- Anja-Katrin Bielinsky and Dudan A. Gerbi(1998). Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin. *Science*, 279, 95-98.
- Braoach, J. R., Y.-Y. Li, J. Feldman, M. Jayaram, J. Abraham, K. A. Nasmyth, and J. B. Hicks(1983). Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*, 47, 1165-1173.
- Brewer, B. J., and W. L. Fangman(1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, 51, 463-471.
- Bruno Amati And Susan M. Gasser(1990). *Drosophila* scaffold-attached region bind nuclear scaffolds and can function as ARS elements in both budding and fission yeasts. *Mol. Cell. Biol*, 10, 5442-5454.
- Chen Yang, James F. Theis and Carol S. Newlon(1999). Conservation of ARS elements and chromosomal DNA replication origins on chromosomesIII of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics*, 152, 993-941.
- Cockerill, P. N., and W. D. Garrad(1986). Chromosomal loop

anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II site. *Cell*, 44, 273-282.

Cockerill, P. N., and W. D. Garrad(1986). Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett*, 204, 5-7.

Dutta, A. and Bell, S. P(1997). Initiation of DNA replication in eucaryotic cell. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*, 13, 293-332.

E. Izaurralde, J. Mirkovitch and U. K. Laemmli(1988). Interaction of DNA with Nuclear Scaffolds in vitro. *J. Mol. Biol*, 200, 111-125.

Edenberg, H. J., and J. A. Huberman(1975). Eucaryotic chromosome replicocation. *Annu. Rev. Genetic*, 9, 245-284

Gasser, S. M., B. B. Amati, M. E. Cardenas, and J. F. X. Hofman(1998). Studies of scaffold attachment sites and their relation to genomic function. p57-96. In K. Jeon(ed.), *IRC reviews in cytology*. Academic Press, Inc., New York.

Gasser, S. M., and U. K. laemmli(1987). A glimpse at chromosomal order. *Trends Genetic*, 3, 16-22.

Goldman, M. A(1988). The chromatin as a unit of gene regulation. *BioEssay* 9, 50-55.

Hsiao, C.-L., and J. Carbon(1979). High-frequency transformation of

yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3829-3833.

Huberman, J. A., L. D. Spotila, K. A. Nawotka, S. M. Ellassouli, and L. R. Davis(1987). The in vivo replication origin of the yeast 2 μ plasmid. Cell, 51, 473-481.

Izaurrealde, E., J. Mirkovitch, and U. K. Leammli(1988). Interaction of DNA with nuclear scaffolds in vitro. J. Mol. Biol, 200, 111-125.

James F. Theis, Chen Yang, Christopher B. Schaefer and Carol S. Newlon(1999). DNA sequence and functional analysis of homologous ARS element of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. Genetics, 152, 943-952.

J.-H. Sohn, E.-S. Choi, C.-H. Kim, M. O. Agaphonov, M. D. Ter-Avanesyan(1996). A novel autonomously replicating sequence(ARS) for multiple intergration in yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. J. Bacteriology, 178, 4420-4428.

Johan G. de Boer, Andrew Suri, David Walsh, Barry W. Glickman(1997). The recovery of a B2 insertion in lacI gene of a rat cell line containing a λ /LIZ shuttle vector. Mutation Research, 375, 79-82.

J. Vigirnia Van Houten and Carol S. Newlon(1990). Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosomeIII. Mol. Cell. Biol, 10, 3917-1925.

Lee M. Ellis, Charles A. Staley, Wenbiao Liu, R. Y. Declan Fleming, Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A (1994) Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Nila U. Parikh, Corazon D. Bucans, and Gary E. Gallick(1998). Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. The Journal of Biological Chemistry, 273, 1052-1057.

Maria Gomez and Francisco Antiquera(1999). Organization of DNA replication origin in the fission yeast genome. EMBO, 18, 5683-5690.

Maxwell P. Lee, Miriam Sander, and Tao-shin Hsieh(1989). Nuclease protection by Drosophila DNA topoisomerase II. The Journal of Biological Chemistry, 264, 21779-21787.

Micheal Syder, Andrew R. Buchman & Ronalds W. Davis(1986). Bent DNA at a yeast autonomously replicating sequence. Nature. 324, 87-89.

Mirkovitch, J., S. M. Gasser, and U. K. Leammli(1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosome. J. Mol. Biol, 200, 101-110

Monique Bearzotti, Elisabeth Perrot, Christine Machard-Vanhee, Genevieve Jolivet, Joe Attal, Marie-Claire Theron, Claudine Puissant, Michel Dreano, J. J. Kopchick, Richard Powell, Franck Gannon,

Louis-Marie Houdebine and Daniel Chourrout(1992). Gene expression following transfection of fish cell line. *Journal of Biotechnology*, 26, 315-325.

Nelson, W. G., K. J. Pienta, E. R. Barrack, and D. S. Coffey(1968). The role of the nuclear matrix in organization and function of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*, 15, 457-475.

Phi-van, L., and W. Stratling(1988). The matrix attachment region of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J*, 7, 655-664.

Robert T. Simpson(1990). Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature*, 343, 387-389.

Rosemary K. Clyne and Thomas J. Kelly(1997). Identification of autonomously replication sequence(ARS) element in eukaryotic cells. *Method : A Companion to Methods in Enzymology*, 13, 221-233.

Ruth E. Kelly, Margaret L. Derosé, Bruce W. Draper, and Geoffrey M. Wahl(1995). Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene. *Mol. Cell. Biol*, 15, 4136-4148.

Stephanie J. Namciu, Karen B. Blochlinger, and R. E. K. Fournier(1998) Human matrix attachment region insulin transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol*, 18, 2382-2391.

Stinchcomb, D. T., C. Mann, E. Selker, and R. W. Davis(1981). DNA sequences that allow the replication and segregation of yeast chromosomes. *Mol. Cell. Biol*, 22, 473-488.

Stinchcomb, D. T., K. Struhl, and R. W. Davis(1979) Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, 282, 39-43.

Sykes, R. C., D. Lin, S. J. Hwang, P. E. Framson, and A. C. Chinault(1988). Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus. *Mol. Gen. Genet.*

Takashi Ohyama, Masaru Miyano & Sadatoshi Sakuma(1999). Influence of highly curved DNA segments on in vivo topology of plasmid. *Molecular Biology Report*, 26, 269-276.

Tun Huang and Judith L. Campbell(1995). Amplification of a circular episome carrying an inverted repeat of the DFR1 locus and adjacent autonomously replicating sequence element of *Saccharomyces cerevisiae*(1995). *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 9607-9614.

York Marahrens and Bruce Stillman(1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, 255, 817-823.

Yukiko Okuno, Hiroyasu Satoh, Mariko Sekiguchi, and Hisao Masukata(1999). Clustered Adenine/Thymine stretches are essential

for function of a fission yeast replication origin. Mol. Cell. Biol, 19, 6699-6709.