

## 대장균에 발현시킨 Human Hepatitis B Virus 중합효소의 특성연구

정지훈 · 노현모<sup>1</sup> · 정구홍\*

서울대학교 생물교육과, <sup>1</sup>서울대학교 분자생물학과

B형 간염 바이러스의 DNA합성에 필수적인 역할을 하는 중합효소의 특성을 조사하였다. 대장균에서 발현시켜 분리한 maltose binding protein (MBP)와 융합된 human HBV 중합효소는 DNA-dependent DNA polymerase 활성과 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 모두 지니고 있다는 것이 확인되었다. Activity gel assay를 통해서 활성을 지닌 MBP-fused HBV 중합효소가 존재하는 것이 확인되었다. 분리된 MBP-fused HBV 중합효소는  $MgCl_2$ 의 농도 2.5 mM에서 DNA-dependent DNA polymerase 활성과 RNA-dependent DNA polymerase 활성이 최고치를 나타냈으며,  $MnCl_2$ 의 농도 1.0 mM과 0.25 mM에서 각각 최대 활성을 나타냈다. KCl은 MBP-fused HBV 중합효소의 두 활성에 대해 저해효과를 나타냈다. MBP-fused HBV 중합효소는 pH 7.0~7.7에서 안정한 효소활성을 나타내었으며, DNA-dependent DNA polymerase 활성은 pH 7.4에서, RNA-dependent DNA polymerase 활성은 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 나타냈다. MBP-fused HBV 중합효소는 반응시간의 증가에 따라서 효소활성도가 증가함을 볼 수 있었다.

**KEY WORDS** □ human hepatitis B virus, MBP-fused HBV polymerase, DNA-dependent DNA polymerase activity, RNA-dependent DNA polymerase activity

Hepatitis B virus (HBV)는 hepadnaviridae에 속하며, 이 바이러스에 의한 감염에 의해서 간염을 동반하기도 하며 일부는 간암으로 발전하기도 한다. HBV의 genome은 3.2 Kb 크기의 부분적 이중나선 DNA이며 core (nucleocapsid), surface (envelope), 중합효소 (P), X 단백질을 암호화 하는 네개의 open reading frame (ORF)을 포함하고 있다. 그 중에서 중합효소를 암호화 하고있는 ORF는 전체 genome의 80%를 차지하고있다 (28).

HBV의 생활사는 크게 네 단계로 나눌 수 있다: (i) virion의 세포표면부착과 uncoating, 바이러스 genomic DNA의 핵 내로의 전이 (8), (ii) 핵 내에서의 covalently closed circular DNA (cccDNA)의 형성과 viral RNA로의 전사 (10), (iii) replicative complex의 형성과 원형질 내에서의 자손 DNA의 복제 (19), 그리고 (iv) virion으로 합체되어 세포밖으로 나간다. Summers와 Mason은 Human HBV와 유사한 Duck HBV (DHBV)에 대한 연구를 통해서 DNA의 합성은 pregenomic RNA로부터의 minus strand DNA의 복제로 시작되며, 이 과정은 바이러스에서 유래한 중합효소에 의해서 이루어진다는 것을 밝혔다 (25). DHBV의 중합효소는 N-말단부분에 priming 활성을 지녔으며 (1, 29), 단백질의 중간부와 C-말단부분에는 DNA polymerase/reverse transcriptase domain과 RNase H domain을 암호화 하고 있다는 것이 중합효소의 computer analysis (28)와 mutational analysis (23)에 의해서 밝혀졌다. 또한

중합효소는 encapsidation 과정에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라 RNA와 DNA에 결합하는 성질을 지녔다 (12).

Human HBV 중합효소에 대해서는 baculovirus 발현시스템을 이용해서 활성이 없는 HBV 중합효소를 발현시킨 것 (17)과 바이러스 particle에서 얻은 소량의 중합효소를 activity gel assay를 통해서 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 지닌 사실을 확인한 것 (2), 그리고 *in vitro* transcription을 이용하여 oocyte에서 활성을 지닌 소량의 Human HBV 중합효소를 발현시킨 것 (16) 등 제한된 연구만이 수행되어 왔으며 Human HBV 중합효소의 생화학적 특성을 연구하기에 충분한 양의 중합효소를 분리해 낼 수가 없었다.

본 연구실에서는 HBV 중합효소를 maltose binding protein (MBP)과 융합시킨 형태로 대장균에서 대량발현시켜서 활성형의 HBV 중합효소를 분리하는데 성공하였다 (14). 본 연구에서는 대장균에서 발현시켜 분리한 활성형의 MBP-fused HBV 중합효소를 activity gel assay를 통해 이 효소의 활성이 MBP-fused HBV 중합효소에서 유래한 것임을 증명하고, 이 효소의 특성에 대해서 조사하였다.

### 재료 및 방법

Plasmid, strain and media

MBP-fused HBV 중합효소의 발현을 위한 maltose

binding protein (MBP)-fusion expression vector인 pMAL-C<sub>2</sub>는 New England Biolabs에서 구입하였으며, MBP와 융합된 HBV 중합효소의 발현을 위해 사용된 균주는 *E. coli* NM522 [*F'* *lacI<sup>q</sup>* (*lacZ*)M15 *pro AB/supE thiΔ* (*lac-proAB*) (*hsdMS-mcrB*)5(*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>-McrB*-)]이다. 융합단백질의 발현백터인 pMPLX의 클로닝과정은 Lee *et al.* (14)에 자세히 설명되어 있다. 세포배양에 사용된 배지는 2xYT (15 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl)이며, 융합단백질의 발현을 위한 induction배지는 glucose 배양액 (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 2 g/l glucose)이다.

#### MBP-fused HBV 중합효소의 분리

MBP와 융합된 HBV 중합효소의 분리는 Lee *et al.* (14)에서 제시한 방법을 사용하였다.

#### 단백질 정량

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Bradford법 (3)에 의하여 595 nm에서 비색정량 하였다.

#### MBP-fused HBV 중합효소의 DNA-dependent DNA polymerase activity와 RNA-dependent DNA polymerase activity 측정

정제한 MBP-fused HBV 중합효소 0.5  $\mu$ g을 standard polymerase-reaction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM DTT, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% NP-40)와 50 ng의 template, 2  $\mu$ Ci의 <sup>32</sup>P-dTTP (~3000 Ci/mmol)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 (standard polymerase-reaction condition), 최종농도 50 mM의 EDTA를 첨가하여 반응을 정지시켰다. Template로 DNA-dependent DNA polymerase (DDDP) assay에는 United States Biochemical에서 구입한 poly (dA)·oligo (dT)를 사용하였으며 RNA-dependent DNA polymerase (RDDP) assay에는 Pharmacia에서 구입한 poly (rA)·oligo (dT)를 사용하였다. 반응액 50  $\mu$ l를 DEAE-cellulose (DE-81) paper disk에 흡착시킨 후 0.5 M sodium phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)로 4회, 증류수로 2회, 그리고 95% ethanol로 씻어준 후 말려서 scintillation cocktail (5.5 g/l PPO, 0.15 g/l POPOP)을 넣고 liquid scintillation counter로 <sup>32</sup>P-dTTP가 incorporation된 양을 측정하였다.

#### Activity gel assay

정제한 중합효소를 65 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA, 1% SDS, 그리고 1%  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함한 sample buffer로 희석하여, 상온에서 20분간 방치한 다음 50  $\mu$ g/ml의 activated salmon sperm DNA를 포함한 0.02% SDS-8% polyacrylamide gel에서 150 V (constant voltage)로 1시간 30 분간 전기영동하였다. 이 gel을 4°C, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)에서 30분씩 4회 씻어서 SDS를 제거한 후, 4°C, 동일한 완충용액에서 20시간 동안 renaturation을 하였다. 이 gel을 각 10  $\mu$ M의 dATP, dCTP, dGTP와 20  $\mu$ Ci의 <sup>32</sup>P-dTTP를 포함한

polymerase-reaction buffer [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% NP-40]에 넣고 37°C에서 15시간 동안 반응시킨 후, washing buffer (1% sodium pyrophosphate, 5% trichloroacetic acid)로 4°C에서 1시간씩 5회 씻어서 vacuum dryer (Bio-Rad)에서 건조시킨 다음 autoradiography를 시행하였다.

#### MBP-fused HBV 중합효소의 특성조사

Standard polymerase-reaction condition [50 mM Tris-Cl (pH 8.3), 5 mM DTT, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% NP-40, 50 ng template, 2  $\mu$ Ci <sup>32</sup>P-dTTP]에서 2가 양이온 (MgCl<sub>2</sub>와 MnCl<sub>2</sub>)의 농도변화 (0~50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0~5 mM MnCl<sub>2</sub>)에 대한 활성 측정과 1가 양이온 (KCl)의 농도변화 (0~400 mM KCl)에 대한 활성측정, pH 6.0에서 pH 9.6까지의 변화에 따른 활성측정, 그리고 반응시간을 1분에서 120분까지 변화시켜가며 효소활성도를 측정하였다.

## 결 과

#### Activity gel assay

활성을 지닌 MBP-fused HBV 중합효소가 대장균에 형질전환시킨 발현백터에서 유래한 단백질임을 확인하고 활성을 지닌 단백질의 크기를 알아보기 위해서 activity gel assay를 수행하였다. Activity gel assay로부터 활성을 지닌 134 kDa의 MBP-fused HBV 중합효소를 볼 수 있었다 (Fig. 1, lane 4).

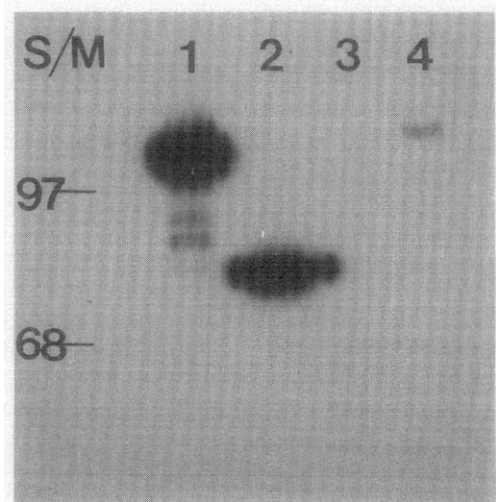
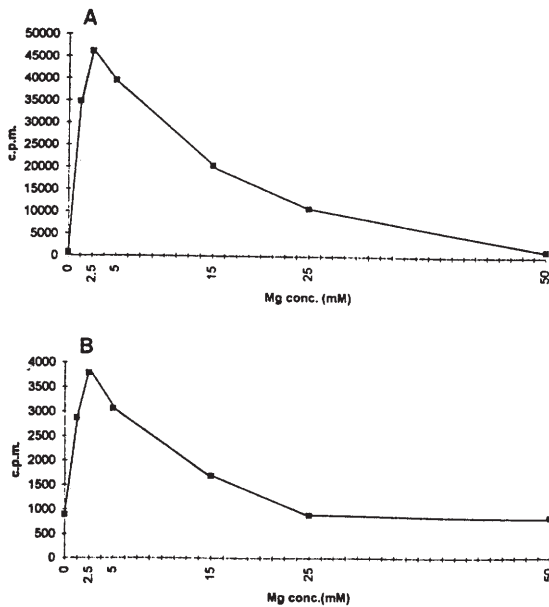
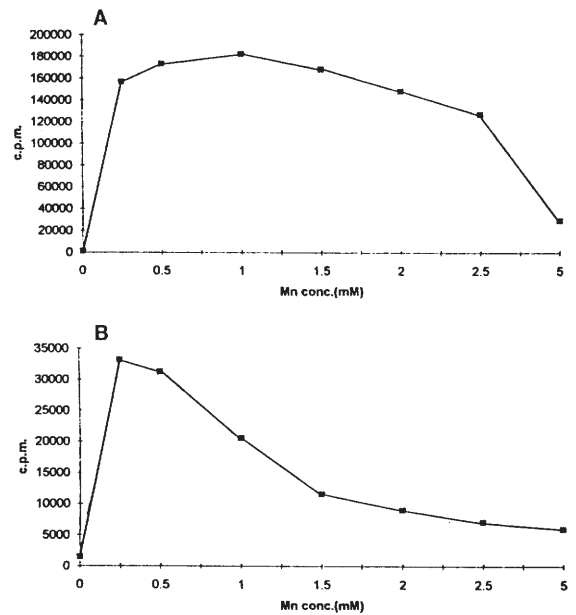


Fig. 1. Polymerase activity gel assay.

S/M, molecular weight standard; lane 1, *E. coli* DNA polymerase I; lane 2, Klenow fragment; lane 3, purified maltose binding protein (MBP) expressed in *E. coli*; lane 4, purified MBP-fused human HBV polymerase expressed in *E. coli*.



**Fig. 2.** Effect of a divalent cation,  $Mg^{2+}$  on the activity of the MBP-fused human HBV polymerase. Effect of  $Mg^{2+}$  concentration on the DNA-dependent DNA polymerase activity (A) and RNA-dependent DNA polymerase activity (B) of the HBV polymerase. [ $^{32}P$ ]dTTP incorporation into poly(dA)·oligo(dT) template (A) and into poly(rA)·oligo(dT) template (B) were shown.



**Fig. 3.** Effect of a divalent cation,  $Mn^{2+}$  on the activity of the MBP-fused human HBV polymerase. Effect of  $Mn^{2+}$  concentration on DNA-dependent DNA polymerase activity (A) and RNA-dependent DNA polymerase activity (B) of the HBV polymerase. [ $^{32}P$ ]dTTP incorporation into poly(dA)·oligo(dT) template (A) and into poly(rA)·oligo(dT) template (B) were shown.

MBP-fused HBV 중합효소의 발현숙주인 대장균의 DNA polymerase I (109 kDa)과 다른 크기 (134 kDa)의 band로 보아 대장균으로부터 분리한 단백질이 대장균의 DNA polymerase I이 아니며, 형질 전환시킨 발현벡터(pMPLX)에서 유래한 단백질을 확인할 수 있었다.

#### MBP-fused HBV 중합효소의 특성

**2가 양이온의 영향:**  $MgCl_2$ 와  $MnCl_2$ 의 농도변화에 따른 *E. coli*에서 발현시켜 분리한 MBP-fused HBV 중합효소의 효소활성변화를 통해 2가 양이온의 최적농도를 알아보았다. Fig. 2와 Fig. 3에서 2가 양이온의 존재가 효소의 활성에 필수적인 역할을 하는 것을 볼 수 있었다.  $MgCl_2$ 는 DDDP 활성과 RDDP 활성이 모두 2.5 mM에서 최고치의 활성을 나타내었다 (Fig. 2A, B).  $MnCl_2$ 에 대해서는 DDDP 활성은 0.25 mM에서 2.0 mM까지 안정한 활성을 보이며 1.0 mM에서 가장높은 효소활성을 나타내었다 (Fig. 3A). RDDP 활성은 0.25 mM에서 뚜렷한 효소활성의 증가를 나타내었다 (Fig. 3B).

**1가 양이온의 영향:** KCl의 농도변화에 따른 MBP-fused HBV 중합효소의 효소활성변화를 통해 1가 양이온의 영향을 알아보았다. MBP-fused HBV

중합효소는 1가 양이온인  $K^+$ 에 의해 효소의 DDDP 활성 (Fig. 4A)과 RDDP 활성 (Fig. 4B)이 저해되는 양상을 나타내었다. 25 mM 이하의 KCl 농도에서도 효소활성저해가 나타났으며, 70 mM 정도의 KCl 존재하에서는 50% 이상의 효소활성저해를 보였다.

**pH의 영향:** pH의 변화에 따른 MBP-fused HBV 중합효소의 활성변화를 측정하기 위해 pH 6.0에서 pH 9.6까지의 50 mM Tris-Cl을 완충용액으로 사용하였다. MBP-fused HBV 중합효소의 DDDP 활성과 RDDP 활성이 모두 pH 7.0에서 pH 7.7까지 범위에서 높은 활성도를 나타내었으며, DDDP 활성은 pH 7.4에서 가장 높게 나타났으며 (Fig. 5A), RDDP 활성은 pH 7.0에서 최대치를 나타내었다 (Fig. 5B).

#### 반응시간증가에 따른 효소활성의 변화

Standard polymerase-reaction condition에서 반응시간을 1분에서 120분까지 증가시키며  $^{32}P$ -dTTP의 incorporation 정도를 측정하였다. 반응시간이 120분까지 증가함에 따라 DDDP (Fig. 6A)와 RDDP (Fig. 6B) 활성도가 모두 증가하는 것을 볼 수 있었다.

#### 고 찰

대장균내에서 발현시켜 분리한 MBP-fused HBV

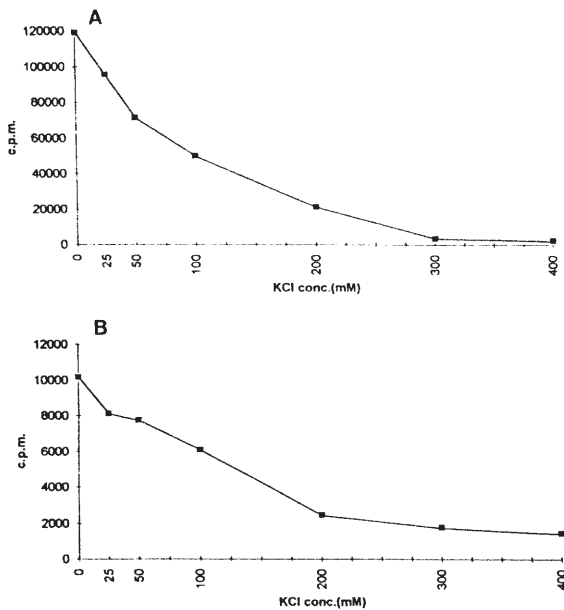


Fig. 4. Effect of KCl on the activity of the MBP-fused human HBV polymerase.

Effect of the concentration of KCl on DNA-dependent DNA polymerase activity (A) and RNA-dependent DNA polymerase activity (B) of the HBV polymerase. Poly(dA)·oligo(dT) was used as a template for DNA-dependent DNA polymerase assay (A) and poly(rA)·oligo(dT) was used as a template for RNA-dependent DNA polymerase assay (B).

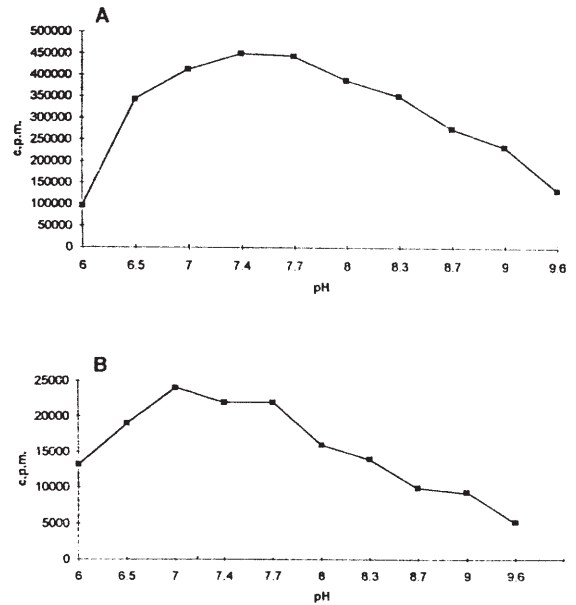


Fig. 5. Response of the MBP-fused human HBV polymerase to variation in pH.

DNA-dependent DNA polymerase assay (A) and RNA-dependent DNA polymerase assay (B) were carried out as described under Materials and Methods. Poly(dA)·oligo(dT) template and poly(rA)·oligo(dT) template were used for DNA-dependent DNA polymerase assay (A) and for RNA-dependent DNA polymerase assay (B), respectively.

중합효소는 activity gel assay를 통한 분석결과 134 kDa에서 활성을 지닌 band가 나타나는 것으로 보아 Factor-Xa에 의해 분리되지 않은 MBP (40 kDa)와 HBV 중합효소 (94 kDa)가 융합된 단백질이 중합효소 활성을 나타내는 것을 알 수 있다. 이는 activity

gel assay를 통해서 HBV와 DHBV의 particle내의 HBV 중합효소가 ~90 kDa에서 중합효소 활성이 나타남을 보여주었던 이미 보고된 결과와 일치하는 결과이다 (2, 21). DNA와 RNA template를 이용한 대장균에서 발현시킨 MBP-fused HBV 중합효소의 기

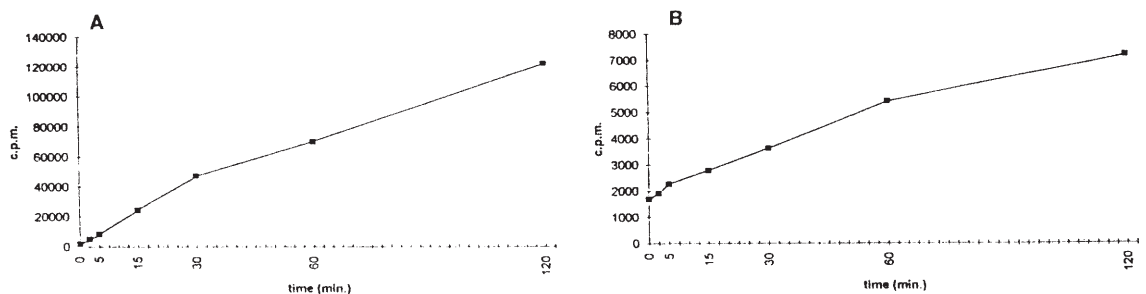


Fig. 6. Time-course reaction of MBP-fused human HBV polymerase.

The amount of incorporated [ $^{32}$ P]-dTTP was measured by liquid scintillation counting. DNA-dependent DNA polymerase assay (A) and RNA-dependent DNA polymerase assay (B) were performed at standard polymerase-reaction condition.



능적인 특성연구 결과 이 단백질은 DDDP 활성과 RDDP 활성 모두를 가지고 있음이 밝혀졌다. 이 사실은 Human HBV 중합효소와 유사한 Duck HBV 중합효소에 대해서 발표되어진 보고 (10, 22, 25)들과 일치하는 결과이다.

$Mn^{2+}$ 이 존재할때의 DDDP와 RDDP 활성이  $Mg^{2+}$ 가 존재할때의 효소활성보다 DDDP 활성은 4배, RDDP 활성은 8배 정도 높게 나타난 것으로 보아 이 protein은 2가 양이온으로  $Mg^{2+}$ 보다  $Mn^{2+}$ 을 더 선호하는 것으로 나타났다.  $Mg^{2+}$ 를 2가 양이온으로 사용했을 경우의 활성이  $Mn^{2+}$ 를 사용했을 때 보다 낮은것은  $Mg^{2+}$  존재시의 processivity가  $Mn^{2+}$  존재 시보다 낮기 때문이라 생각된다. Yeast에서 발현시킨 cauliflower mosaic virus (CaMV)의 역전사효소도 2가 양이온으로서  $Mn^{2+}$  (최적농도 2 mM)을 사용했을때가  $Mg^{2+}$ 를 사용했을 때 보다 더 효과적인 중합 효소활성을 나타내었으며 (26), 대장균에서 발현시킨 moloney murine leukemia virus (M-MuLV)의 역전사효소도 역시  $Mn^{2+}$ 이 2가 양이온으로 사용되었을 때가  $Mg^{2+}$ 를 사용할 때 보다 더 높은 활성을 나타내었다 (24). 그러나, equine infectious anemia virus (EIAV)의 역전사효소는  $Mg^{2+}$  (최적농도 10~15 mM)를 2가 양이온으로 사용했을 때의 효소활성이  $Mn^{2+}$  (최적농도 0.25 mM)을 사용했을때 보다 훨씬 높은 활성도를 나타내었으며 (27), simian immunodeficiency virus (SIV)의 역전사효소의 경우  $Mn^{2+}$ 이 2가 양이온으로 존재시에는 거의 효소활성을 나타내지 않았다 (15). MBP-fused HBV 중합효소는 KCl이 존재하지 않을 때의 효소활성이 가장 높게 나타났다. HIV-1의 역전사효소는 N-terminal domain (p51)과 C-terminal domain (p15)로 구성된 p66과 p51이 heterodimer (p66/p51)로 존재할 때에는 75 mM KCl에서 최대의 활성을 나타내지만, p51만이 존재할 때에는 KCl에 의해서 효소활성이 저해받는 것으로 알려졌다 (9). pH의 변화에 대한 MBP-fused HBV 중합효소의 활성변화를 살펴보면 SIV의 역전사효소의 최적 pH가 pH 8.0~8.2이며 (13), M-MuLV의 역전사효소는 pH 8.0 (7), avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사효소는 pH 8.3 (7)인데 비해서 낮은 pH에서 최대 효소활성을 나타내며, 넓은 pH 범위 (pH 7.0~7.7)에서 안정한 효소활성을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

## 사 사

본 논문은 교육부 학술연구조성비 (유전공학)와 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 세포분화 연구센터)의 연구비지원을 받아 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Bartenschlager, R. and H. Schaller, 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.* 7, 4185-4192.
2. Bavand, M., M. Feitelson, and O. Laub, 1989. The hepatitis B virus associated reverse transcriptase is encoded by the viral *pol* gene. *J. Virol.* 63, 1019-1021.
3. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Chem.* 72, 248-254.
4. Brown, W.C., J.A. Dunean, and J.L. Campbell, 1993. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase  $\delta$  overproduced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 982-990.
5. Enders, G.H., D. Ganem, and H.E. Varmus, 1987. 5'-Terminal sequence influence of the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. *J. Virol.* 61, 35-41.
6. Ganem, D., 1982. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: Mechanisms and consequences. *Rev. Infect. Dis.* 4, 1026-1047.
7. Gerard, G.F. and J.M. D'Alessio, 1993. Reverse transcriptase, p. 73-93. In M.M. Burrell (ed.), *Methods in molecular biology*, Vol. 16: Enzymes of molecular biology. Humana Press Inc., Totowa.
8. Gripon, P., C. Diot, N. Theze, I. Fourel, O. Loreal, C. Brechot, and C. Guguen-Guillouzo, 1988. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.* 62, 4136-4143.
9. Hostomsky, Z., Z. Hostomska, G.O. Hudson, E.W. Moomaw, and B.R. Nides, 1991. Reconstitution *in vitro* of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1148-1152.
10. Howe, A.Y.M., J.F. Elliott, and D.L.J. Tyrrell, 1992. Duck hepatitis B virus polymerase produced by *in vitro* transcription and translation possesses DNA polymerase and reverse transcriptase activities. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189, 1170-1176.
11. Khan, N.N. and N.C. Brown, 1985. Purification and characterization of DNA polymerase alpha of chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biochem.* 68, 169-179.
12. Kochel, H.G., M. Kann, and R. Thomssen, 1991. Identification of a binding site in the hepatitis B virus RNA pregenome for the viral *pol* gene product. *Virology* 182, 94-101.
13. Kraus, G., E. Bher, M. Baier, H. Konig, and R. Kurth, 1990. Simian immunodeficiency virus reverse transcriptase-purification and partial characterization. *Eur. J. Biochem.* 192, 207-213.
14. Lee, H.J., Y.T. Kwon, H.M. Rho, and G. Jung, 1993. Expression of hepatitis B virus polymerase

- gene in *E. coli*. *Biotechnol. Letters* **16**, 821-826.
15. Luke, W., K. Hoefler, D. Moosmayer, P. Nickel, G. Husmann, and K. Jentsch, 1990. Partial purification and characterization of the reverse transcriptase of the simian immunodeficiency virus TYO-7 isolated from an African green monkey. *Biochemistry* **29**, 1764-1769.
  16. Seifer, M. and D.N. Standing, 1993. Recombinant human hepatitis B virus reverse transcriptase is active in the absence of the nucleocapsid or the viral replication origin. DR1. *J. Virol.* **67**, 4513-4520.
  17. McGlynn, E., S. Reutener, A. Matter, G. Wildner, H. Will, and N.B. Lydon, 1992. Hepatitis B virus polymerase gene: Expression of the long open reading frame using the baculovirus expression system. *J. Gen. Virol.* **73**, 1515-1519.
  18. Maina, C.V., P.D. Riggis, A.G. Grandea III, B.F. Slatko, L.S. Moran, J.A. Tagliaote, L.A. McReynolds, and C. Guan, 1988. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-373.
  19. Miller, R.H., P.L. Marison, and S.W. Robinson, 1984. HBV DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology* **139**, 64-72.
  20. Misumi, M. and A. Weissbach, 1982. The isolation and characterization of DNA polymerase from spinach. *J. Biol. Chem.* **257**, 2323-2329.
  21. Oberhaus, S.M. and J.E. Newbold, 1993. Detection of DNA polymerase activities associated with purified duck hepatitis B virus core particles by using an activity gel assay. *J. Virol.* **67**, 6558-6566.
  22. Offensperger, W., E. Walter, S. Offensperger, C. Zeschnigk, H.E. Blum, and W. Gerok, 1988. Duck hepatitis B virus: DNA polymerase and reverse transcriptase activities of replicative complexes isolated from liver and their inhibition *in vitro*. *Virology* **164**, 48-54.
  23. Radziwill, D., W. Tucker, and H. Schaller, 1990. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNase H activity. *J. Virol.* **64**, 613-620.
  24. Roth, M.J., N. Tanese, and S.P. Goff, 1985. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 9326-9335.
  25. Summers, J. and W.S. Mason, 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcriptase of an RNA intermediate. *Cell* **29**, 403-415.
  26. Takatsuji, H., H. Hirochika, T. Fukushi, and J. Ikeda, 1986. Expression of cauliflower mosaic virus reverse transcriptase in yeast. *Nature* **319**, 240-242.
  27. Thomas, D.A. and P.A. Furman, 1991. Purification and kinetic characterization of equine infectious anemia virus reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 1365-1371.
  28. Toh, H., H. Hayashita, and T. Hiyata, 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis-B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature (London)* **305**, 827-829.
  29. Wang, G.H. and C. Seeger, 1992. The reverse transcriptase of hepatitis B virus act as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* **71**, 663-670.

(Received October 17, 1994)

(Accepted October 28, 1994)

# **ABSTRACT: Characterization of Human Hepatitis B Virus Polymerase Expressed in *Escherichia coli***

Jeong, Ji-Hoon, Hyune Mo Rho<sup>1</sup>, and Guhung Jung\* (Department of Biology Education, <sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Human hepatitis B virus polymerase which plays a crucial role of DNA synthesis had been characterized. It was proved that the MBP-fused HBV polymerase has both DNA-dependent DNA polymerase and RNA-dependent DNA polymerase activities. Purified MBP-fused HBV polymerase was identified by using activity gel assay. The purified enzyme, upon analysis in activity gel, displayed a major, 134 kilodalton, catalytically active form. The optimal DNA-dependent DNA polymerase and RNA-dependent DNA polymerase activities of the purified MBP-fused HBV polymerase were observed at 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, whereas in case of MnCl<sub>2</sub>, DNA-dependent DNA polymerase and RNA-dependent DNA polymerase activities of the protein reach their optima at the concentration of 1.0 mM and 0.25 mM, respectively. The addition of KCl reduces both DNA-dependent DNA polymerase and RNA-dependent DNA polymerase activities. Broad optimum between pH 7.0 to pH 7.7 was observed. Optimal activity of DNA-dependent DNA polymerase was shown at pH 7.4, and that of RNA-dependent DNA polymerase was shown at pH 7.0. As reaction-time increased, both DNA-dependent DNA polymerase activity and RNA-dependent DNA polymerase activity were increased.