

한국인 집단의 미토콘드리아 DNA HV1 부위에서의 염기서열 다양성

임시근* · 김응수 · 김순희 · 박기원 · 한면수

국립과학수사연구소 유전자분석과
(2005. 6. 21 접수, 2005. 7. 12 승인)

Sequence diversity of Mitochondrial DNA HV1 in Korean population

Si-Keun Lim*, Eung-Su Kim, Soon-Hee Kim, Ki-won Park and Myun-soo Han

DNA Analysis Division, National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-707, Korea

(Received June 21, 2005, Accepted July 12, 2005)

요 약 : 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석결과는 개인식별 및 신원확인에 매우 유용하게 활용되어지고 있다. 본 연구에서는 한국인 360명을 대상으로 미토콘드리아 DNA 조절부위 HV1에서의 염기서열 다양성에 대해 분석하였다. 염기서열 분석결과 124 곳에서의 변이로부터 210 종류의 haplotypes를 얻을 수 있었다. 이 중에서 55개의 haplotypes는 2명 이상의 사람에게서 발견되었으며, 나머지 155 haplotypes는 오직 한명씩만이 보여주었다. 변이는 C-T 치환이 가장 많았으며, 특히 16223 위치에서는 전체 시료의 75.8%에서 C-T 치환이 발견되었다. 또한 16180에서 16193까지의 14 염기에 대한 염기 다형성을 분석한 결과 20가지의 변이가 발견되었다. 한국인 집단에서 가장 흔한 haplotype은 전체 시료의 5%에 해당하는 [16223T, 16362C]이었으며, [16223T, 16274T, 16362C]가 2.5%로 그 뒤를 이었다. 또한 전체 시료의 25.9%는 적어도 두 시료에서 동일한 haplotype을 나타내었다. Gene diversity는 0.996, 두 사람이 우연히 같은 haplotype을 가질 확률은 0.7%이었다.

Abstract : The human mitochondrial genome (mtDNA) has been an important tool in the field of forensic investigations. Within the entire mtDNA molecule, the non-coding control region which is approximately 1,100 bp including hypervariable region I and II (HV1 and HV2) is widely studied because it is highly polymorphic and useful for human identification purposes. In this study, 360 unrelated Koreans were analyzed in HV1. The number of polymorphic sites and genetic lineage were 124 and 210, respectively. The most prevalent substitution was C-T and 75.8% of DNA showed C-T substitution at 16223. There were 20 kinds of polymorphism between 16180 and 16193 including insertion and deletion. The most frequent haplotype was [16223T, 16362C] representing 5%. Approximately 25.9% of DNA showed the same haplotype in at least two samples. The gene diversity was calculated to 0.996 and the probability of two unrelated persons having the same haplotype was determined to 0.7%.

Key words : mtDNA, control region, HV1, sequence diversity, haplotype

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-2600-4865 Fax : +82-(0)2-2600-4866

E-mail: lskpmr@nisi.go.kr

1. 서 론

미토콘드리아(mitochondria)는 핵(nucleus)과는 별도로 세포질에 존재하는 소기관으로서 한 세포 당 10-100개가 존재하며 각각은 11개까지의 게놈을 가진다. 미토콘드리아 게놈은 16,569 bp로 구성되어 있으며, 13개의 폴리펩티드, 22개의 tRNA 유전자, 2개의 rRNA 유전자를 코딩한다. 포유동물에 있어서 미토콘드리아 DNA(mtDNA)는 모계 유전되어 재조합(recombination) 과정 없이 유전되는 특성을 보여준다.

mtDNA 염기서열 분석은 인류의 진화(human evolution)를 연구하는데 많이 이용되어왔으며, 개인 식별을 목적으로 법과학 분야에서 그 유용성이 날로 증가되고 있다. 특히 모발 모간부, 빠나 치아 등 핵 DNA의 양이 매우 적은 시료나 심하게 부패되어 일반적인 STR(Short Tandem Repeat) 유전자형 분석이 불가능한 시료에서도 mtDNA를 추출할 수 있다. 실제로 30,000년 전의 네안데르탈 화석으로부터 mtDNA를 분리해 염기서열을 분석한 예도 있다.¹ 일반적으로 1981년 영국의 Anderson 등에 의해 밝혀진 인간 mtDNA 염기서열을 표준염기서열(CRS; Cambridge Reference Sequence)로 사용하고 있다.² 돌연변이(mutation)는 mtDNA상의 유전적 변이를 유발하는 유일하면서도 가장 중요한 요인으로서 크게 치환(substitution), 결실(deletion) 및 삽입(insertion)에 의해 유발된다. 이 중에서 가장 흔하게 발견되는 돌연변이는 치환(transition)이며, 긴 진화의 시간으로 볼 때 어떤 부위는 다른 부위에 비해 상대적으로 높은 돌연변이율(mutation rate)을 보여주고 있다.³ 미토콘드리아 게놈상의 치환률(substitution rate)는 핵 DNA의 경우에 비해 약 5-10배 정도로 매우 높으며,⁴ 특히 조절 부위는 다른 부위에 비해 5-20배 정도 빠르게 진화하는 것으로 추정되고 있다.⁵ 조절부위(control region)는 D-loop(Displacement loop)로도 불리며 약 1,100 bp 크기로 복제시작점을 비롯해 다양한 조절인자를 포함하고 있다. 대부분의 mtDNA 변이는 조절부위에서 각각 400 bp 길이의 두 과변이부위(hypervariable region)인 HV1 및 HV2에 집중되어 있다. mtDNA의 높은 돌연변이율로 인해 소위 'heteroplasmy'가 종종 발견되는데, 이로 인해 동일인이나 동일모계인 사람 사이에서도 차이가 날 수 있으므로 결과 해석에 특히 신중을 기해야 한다.⁶

특정 인종집단 내에서의 mtDNA haplotypes의 출현빈도는 mtDNA typing의 법과학적 응용을 위해 특히 중요하며, 점점 더 세계화되어가는 각국의 추세로 볼 때 mtDNA 분석을 통한 인종 구분도 점차 주목받고 있다.

따라서 본 연구에서는 한국인 집단을 대상으로 미토콘드리아 DNA 조절부위에 위치한 HV1에서의 염기서열 다양성을 조사하였으며, 1997년 Lee 등⁷에 의해 발표된 결과와 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. DNA 시료

본 연구에 사용된 DNA 시료는 유전적으로 연관성이 없는 한국인 360명의 혈액으로부터 QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용해 추출하였으며, 아가로스 겔 전기영동을 통해 정량한 후 약 1.0 ng/ μ L의 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

2.2. PCR 증폭

mtDNA HV1의 증폭을 위해 L15971(5'-TTAACTCCAC-CATTAGCACC-3')과 H16391(5'-GAGGATGGTGGTCA-AGGGAC-3')을 각각 forward 및 reverse primer로 사용하였다. PCR 반응액 25 μ L 내에는 1.0 ng의 시료 DNA, 1x AmpliTaq Gold buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M의 각 dNTP, 4 μ g BSA, 100 μ M의 프라이머 및 1.0U AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)가 포함되었다. 증폭기는 GeneAmp 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster USA)를 사용하였으며 증폭 프로그램은 다음과 같았다; 95 °C에서 11분간 반응시키고, 32 cycles of 95 °C에서 20초, 56 °C에서 30초, 72 °C에서 45초의 반응을 32회 반복한 후 72 °C에서 7분간 반응시켰다. PCR 증폭산물은 1.5%의 아가로스 겔 상에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 확인하였으며, QIAquick PCR product purification kit (Qiagen)를 이용해 남아있는 뉴클레오타이드와 프라이머를 제거하였다.

2.3. DNA 염기서열 분석

총 330 bp(16051-16380)의 HV1 PCR 증폭산물의 DNA 염기서열 분석을 위해 먼저 PCR 증폭산물을 QIAquick PCR product purification kit(Qiagen)을 이용해 정제한 후 BigDye Version 3.0 kit(Applied Biosystems)를 사용해 cycle sequencing 반응을 수행하였다. Dye의 제거와 sequencing 산물의 정제는 DyeEx spin kit(Qiagen)을 사용하였으며, 정제된 산물은 POP-6, 36-cm capillary 및 ABI310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 사용해 분석하였다. Forward 및 reverse 염기서열은 BioEdit software를 사용해 정렬한 후 분석하였다. Gene diversity

는 Tajima 등⁸에 의한 $h = (1 - \Sigma X^2) / (n(n-1))$ (n =the sample size, X =the frequency of each mtDNA type) 식에 따라 계산하였으며, 두 사람이 우연히 일치되는 haplotype을 가질 확률은 $p = \Sigma X^2$ 식에 따라 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 360명의 한국인을 대상으로 분석된 mtDNA HV1 부위 330 bp의 nucleotides (16051-16380)

Mt HV-I Sequence variations (N=360), 16051-16380

16051	16052	16053	16054	16055	16056	16057	16058	16059	16060	16061	16062	16063	16064	16065	16066	16067	16068	16069	16070	16071	16072	16073	16074	16075	16076	16077	16078	16079	16080	
A	C	C	A	C	C	C	A	A	G	T	A	T	T	T	G	A	C	T	C	A	C	C	A	T	C	A	A	C	A	
G4																														
16081	16082	16083	16084	16085	16086	16087	16088	16089	16090	16091	16092	16093	16094	16095	16096	16097	16098	16099	16100	16101	16102	16103	16104	16105	16106	16107	16108	16109	16110	
A	C	C	G	C	T	A	T	G	T	A	T	T	T	C	G	T	A	C	A	T	T	A	C	T	G	C	C	A	G	
					C6																									
16111	16112	16113	16114	16115	16116	16117	16118	16119	16120	16121	16122	16123	16124	16125	16126	16127	16128	16129	16130	16131	16132	16133	16134	16135	16136	16137	16138	16139	16140	
C	C	A	C	C	A	T	G	A	A	T	A	T	T	G	T	A	C	G	G	T	A	C	A	T	A	A	T	A	T	
T8																														
16141	16142	16143	16144	16145	16146	16147	16148	16149	16150	16151	16152	16153	16154	16155	16156	16157	16158	16159	16160	16161	16162	16163	16164	16165	16166	16167	16168	16169	16170	
A	C	T	T	G	A	C	A	C	C	T	G	T	A	G	T	A	C	A	A	T	A	A	A	A	A	C	C	C	A	
16171	16172	16173	16174	16175	16176	16177	16178	16179	16180	16181	16182	16183	16184	16185	16186	16187	16188	16189	16190	16191	16192	16193	16194	16195	16196	16197	16198	16199	16200	
A	T	C	C	A	C	A	T	C	A	A	A	A	A	C	C	C	C	T	C	C	C	C	A	T	G	C	T	T	A	
G3	C31	T2	T11		T1			T1		G1	C31	C48	T10	T6	T1	T23	T1	T81												
16201	16202	16203	16204	16205	16206	16207	16208	16209	16210	16211	16212	16213	16214	16215	16216	16217	16218	16219	16220	16221	16222	16223	16224	16225	16226	16227	16228	16229	16230	
C	A	A	G	C	A	A	G	T	A	C	A	G	C	A	A	T	C	A	A	C	C	C	T	C	A	A	C	T	A	
16231	16232	16233	16234	16235	16236	16237	16238	16239	16240	16241	16242	16243	16244	16245	16246	16247	16248	16249	16250	16251	16252	16253	16254	16255	16256	16257	16258	16259	16260	
T	C	A	C	A	C	A	T	C	A	A	C	T	G	C	A	A	C	T	C	C	A	A	A	G	C	C	A	C	C	
C10	T1		T18	G4				T3		T1		C7		T8																
16261	16262	16263	16264	16265	16266	16267	16268	16269	16270	16271	16272	16273	16274	16275	16276	16277	16278	16279	16280	16281	16282	16283	16284	16285	16286	16287	16288	16289	16290	
C	C	T	C	A	C	C	C	A	C	T	A	G	G	A	T	A	C	C	A	A	C	A	A	A	A	C	C	T	A	C
T25																														
16291	16292	16293	16294	16295	16296	16297	16298	16299	16300	16301	16302	16303	16304	16305	16306	16307	16308	16309	16310	16311	16312	16313	16314	16315	16316	16317	16318	16319	16320	
C	C	A	C	C	C	T	T	A	A	C	A	G	T	A	C	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	A	A	A	G	C
T11	T4	G3	T10	T16		C8	C31	G1	G1		G1		C28																	
16321	16322	16323	16324	16325	16326	16327	16328	16329	16330	16331	16332	16333	16334	16335	16336	16337	16338	16339	16340	16341	16342	16343	16344	16345	16346	16347	16348	16349	16350	
C	A	T	T	T	A	C	C	G	T	A	C	A	T	A	G	C	A	C	A	T	T	A	A	A	A	A	T	C	A	A
16351	16352	16353	16354	16355	16356	16357	16358	16359	16360	16361	16362	16363	16364	16365	16366	16367	16368	16369	16370	16371	16372	16373	16374	16375	16376	16377	16378	16379	16380	
A	T	C	C	C	T	T	C	T	C	G	T	C	C	C	C	A	T	G	G	A	T	G	A	C	C	C	C	C	C	C

Fig. 1. Summary of sequence variations in mtDNA HV1(16051-16380) from 360 Koreans. Green and purple boxes indicated transition and transversion, respectively.

Table 1. Type of variations in mtDNA HV1 from 360 Koreans

		N = 360	
		No. of positions	Total No. of mutations
Transitions	C-T	49	577
	T-C	28	461
	A-G	35	90
	G-A	7	150
	total	119	1,278
Transversions	C-A	6	31
	A-C	9	90
	C-G	3	5
	G-C	1	5
	T-G	0	0
	G-T	1	1
	A-T	5	8
	T-A	2	2
	total	27	142
	Insertions	T	0
G		0	0
A		0	0
C		2	2
total	2	2	
Deletions	T	0	0
	G	0	0
	A	0	0
	C	1	1
total	1	1	

가운데 124곳(37.6%)에서 CRS와 다른 변이가 발견되었다(Fig. 1). 가장 흔한 변이는 C-T transition이었으며, 전체적으로 transition이 transversion에 비해 9배 정도 많았다(Table 1). 또한 총 210종류의 haplotypes이 나타났으며 이 중 55가지(25.9%)의 haplotypes는 적어도 2명 이상의 사람들이 서로 같았다(Table 2).

한국인 집단에서 가장 흔한 haplotype은 5%의 한국인에게서 발견된 [16223 T, 16362 C]이었다. [16223 T, 16274 T, 16362 C]은 2.5%로 두 번째로 많은 사람들에게서 발견되었는데, 이 haplotype은 1997년 Lee 등⁷에 의해 발표된 논문에서는 보고되지 않은 것이었다. 가장 변이가 높은 위치는 16223로 75.8%의 시료에서 C-T 변이가 발견되었으며, 16362가 43.3%로 두 번째로 많은 변이를 보여주었다(Table 3). 이는 일본인에 대한 연구결과와는 유사하였으나 흑인(African)이나 백인

Table 2. The most frequent haplotypes in Koreans

Rank	No.	Frequency (%)	Haplotypes
1	18	5.0	16223 T, 16362 C
2	9	2.5	16223 T, 16274 T, 16362 C
3	8	2.2	16187 T, 16223 T, 16290 T, 16319 A 16223 T, 16278 T, 16362 C
5	7	1.9	16129 A, 16162 G, 16172 C, 16304 C 16129 A, 16223 T, 16362 C
7	6	1.7	16172 C, 16223 T, 16257 A, 16261 T 16174 T, 16223 T, 16362 C 16223 T, 16290 T, 16319 A
10	5	1.4	16129 A, 16140 C, 16187 T, 16189 C, 16266 A 16129 A, 16189 C, 16223 T, 16297 C, 16298 C 16223 T
15	4	1.1	16066 G, 16223 T, 16311 C 16126 C, 16223 T, 16235 G, 16290 T, 16311 C, 16319 A 16223 T, 16227 G, 16278 T, 16362 C 16223 T, 16294 T, 16295 T 16223 T, 16295 T, 16319 A
20	3	0.8	16093 C, 16129 A, 16223 T, 16362 C 16126 C, 16231 C, 16266 T 16129 A, 16213 A, 16223 T, 16290 T, 16319 A 16129 A, 16223 T, 16294 T, 16362 C 16154 C, 16182 C, 16183 C, 16189 C, 16217 C, 16261 T 16182 C, 16183 C, 16189 C, 16217 C, 16261 T 16184 T, 16223 T, 16290 T, 16293 C, 16319 A 16189 C, 16223 T 16209 C, 16223 T, 16324 C 16223 T, 16319 A, 16362 C
30	2	0.56	16093 C, 16174 T, 16223 T, 16288 C, 16327 T 16126 C, 16231 C, 16266 T, 16319 C 16129 A, 16140 T, 16187 T, 16189 C, 16266 G 16129 A, 16150 T, 16223 T, 16298 C, 16327 T 16129 A, 16167 T, 16223 T, 16234 T, 16316 G, 16362 C 16129 A, 16172 C, 16223 T, 16362 C 16129 A, 16183 C, 16189 C, 16223 T, 16297 C, 16298 C 16136 C, 16183 C, 16189 C, 16217 C, 16284 G 16169 T, 16192 T, 16223 T, 16290 T, 16319 A, 16354 T, 16362 C 16171 G, 16223 T, 16291 T, 16311 C, 16362 C 16172 C, 16223 T, 16250 T, 16257 A, 16261 T 16174 T, 16223 T, 16311 C, 16317 G, 16362 C 16182 C, 16183 C, 16189 C, 16217 C, 16261 T, 16288 C, 16311 C 16182 C, 16183 C, 16189 C, 16217 C, 16295 T 16184 T, 16223 T, 16298 C, 16319 A 16185 T, 16223 T, 16260 T, 16298 C 16187 T, 16189 C, 16223 T, 16290 T, 16319 A 16189 C, 16216 G, 16223 T 16207 G, 16304 C, 16362 C 16209 C, 16223 T, 16362 C 16221 T, 16304 C 16223 T, 16234 T, 16316 G, 16362 C 16223 T, 16234 T, 16362 C 16223 T, 16245 T, 16362 C 16223 T, 16293 G, 16362 C 16245 T, 16362 C
		25.9%	55 haplotypes among 210 haplotypes

Table 3. The most variable positions in mtDNA HV1

Rank	Positions	Frequency (%)	
		This study	Lee <i>et al.</i> ⁷
1	16223	75.8	78
2	16362	43.3	39.9
3	16189	22.5	15.4
4	16129	19.4	22.2
5	16319	17.5	14.1
6	16183	14.4	6.2
7	16290	11.9	9.2
8	16311	10.8	13.4
	16182	8.6	2.61
9	16298	8.6	8.5
	16172	8.6	0
12	16187	6.4	7.5

(Caucasian)에 대한 결과와는 큰 차이를 보여주었다. CRS와 비교한 변이의 개수는 0-11개 이었으며, 평균은 4.19개 이었고 이중에서 3개의 변이가 일어난 시료가 26.9%

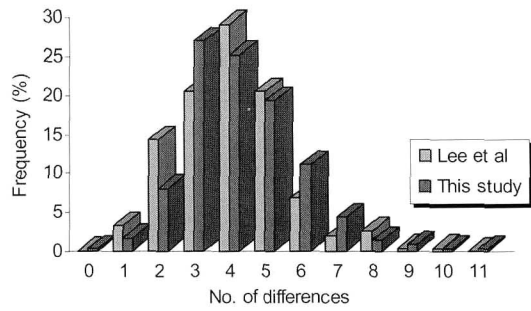


Fig. 2. The frequency of the number of variation in mtDNA HV1.

로 가장 많았다(Fig. 2).

16189 위치의 T-C transition은 소위 C-stretch를 유발하게 되는데, 본 연구에서 분석된 시료 중 19.7%에서 발견되었으며, 16180-16193 부위 14곳에서의 변이는 총 32.8%의 시료에서 관찰되어 HV1 내에서 가장 변이가 심한 부분이었다(Table 4). mtDNA HV1 부위 중 16051-

Table 4. The sequence polymorphism between 16180 and 16193

Variations	Types	Number Observed			
		NISI ^a		Maruyama ^b	
		n	%	n	%
16180 - 16193 (14 bp)					
AAAA CCCCCTCCCC^c	CRS	242	67.2	128	62.8
A G AC CCCCC C CCCC	16181 G, 16183 C, 16189 C	1	0.28	-	-
AA CC CCCCC C CCCC	16182 C, 16183 C, 16189 C	32	8.9	14	6.9
AA G A CCCCCTCCCC	16183 C	1	0.28	-	-
AAA C CCCCC C CCCC	16183 C, 16189 C	16	4.4	9	4.4
AAA G CCCCCTCCCC	16183 G	1	0.28	-	-
AAA C CCCCC C CCCC	16183 G, 16189 C	1	0.28	-	-
AAA T CCCCCTCCCC	16183 T	1	0.28	-	-
AAAA A CCCC C CCCC	16184 A, 16189 C	1	0.28	-	-
AAAA T CCCCCTCCCC	16184 T	9	2.5	3	1.5
AAAA CCCCC C TCCCC C ^d	16188.1 C, 16193.1 C	1	0.28	5	2.5
AAAA C TCCCTCCCC	16185 T	5	1.4	2	1.0
AAAA C T E CC C CCCC ^e	16185 T, 16189 C, 16193 dC	1	0.28	-	-
AAAA CC T CCCTCCCC	16186 T	1	0.28	-	-
AAAA CCC T CTCCCC	16187 T	11	3.1	9	4.4
AAAA CCC T C CCCC	16187 T, 16189 C	11	3.1	4	2.0
AAAA CCCC T TCCCC	16188 T	1	0.28	-	-
AAAA CCCC C TCC T C	16188 G, 16192 C	1	0.28	-	-
AAAA CCCCC C CCCC	16189 C	19	5.3	5	2.5
AAAA CCCCCTCC T C	16192 T	4	1.1	3	1.5
Total number		360		204	

a; this study, b; Maruyama *et al.*, c; same to Cambridge Reference Sequence, d; addition, e; deletion

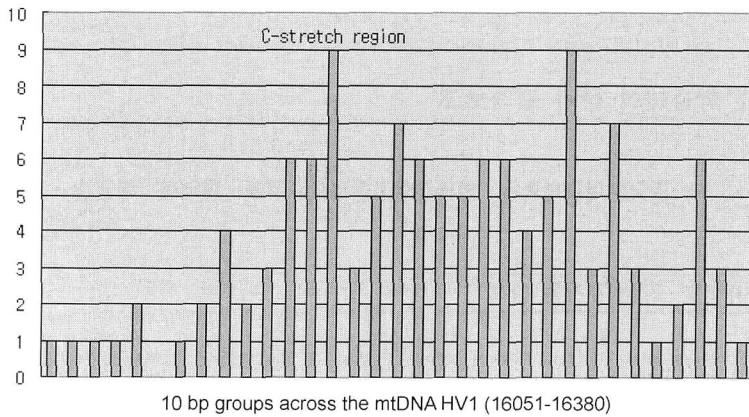


Fig. 3. The number of differences in 10 bp groups across the mtDNA HV1(base range from 16051-16380).

16380(330 bp)에 대한 변이 빈도를 Fig. 3에 그래프로 나타내었다. 이러한 결과로부터 gene diversity는 0.996으로 계산되었으며, 두 사람이 우연히 같은 haplotype을 가질 확률은 0.7%이었다.

본 연구에서 얻어진 한국인 집단에 대한 미토콘드리아 DNA HV1의 염기서열 다양성에 관한 결과는 법과학 분야에서 매우 중요한 개인 식별 및 신원 확인을 위한 기본 자료로 유용하게 사용될 수 있을 뿐 아니라, 한국인에 대한 집단유전학적 연구를 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. M. Krings, A. Stone, R. W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking and S. Paabo, Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19-30(1997).
2. S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staen and I. G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465(1981).
3. S. Meyer, G. Weiss and A. von Haeseler, Pattern of

nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*, **152**, 1103-1110(1999).

4. W. M. Brown, M. Jr George and A. C. Wilson, Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1967-1971(1979).
5. S. Sigurdardottir, A. Helgason, J. R. Gulcher, K. Stefansson and P. Donnelly, The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 1599-1609(2000).
6. G. Tully, W. Bar, B. Brinkmann, A. Carracedo, P. Gill, N. Morling, W. Parson and P. Schneider, Considerations by the european DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci. Int.*, **124**, 83-91(2001).
7. S. D. Lee, C. H. Shin, K. B. Kim, Y. S. Lee and J. B. Lee, Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans. *Forensic Sci. Int.*, **87**, 99-116(1997).
8. F. Tajima, Statistical method for testing the natural mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595(1989).