

바이러스 생활환의 후기 단계에 작용하는 항AIDS제의 탐색을 위한 HIV-1 Complementation System의 응용

한림대학교 자연과학대학 유전공학과 및 의과대학 약리학교실¹

류지윤 · 최수영 · 김영희¹ · 박진서*

=Abstract=

Application of HIV-1 Complementation System to Screen the Anti-AIDS Agents That Targets the Late Stage of HIV-1 Replication Cycle

Jiyeon Ryu, Soo Young Choi, Yung Hi Kim¹ and Jinseu Park*

Department of Genetic Engineering, Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Department of Pharmacology¹, College of Medicine, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Continuous efforts are being made to find effective therapeutic agents against HIV-1, the causative agents of AIDS. In this study, we developed a cell-based assay system employing a *trans*-complementation for production of recombinant viruses which are capable of undergoing one round of replication in CD4⁺ T cells. This assay system was tested for ability to screen the agents that act at late stage of HIV-1 life cycle. The effect of a protease inhibitor on the *trans*-complementation assay was assessed. Recombinant HIV-1 viruses were prepared from a *trans*-complementation in the presence of various concentrations of protease inhibitor. Inhibition of single round infection of these recombinant viruses by protease inhibitor was observed to be a dose-dependent manner. Inhibitory effects of a protease inhibitor on HIV-1 Gag polyprotein processing by HIV-1 protease was detected at concentrations of the protease inhibitor compatible with inhibition of virus infection, confirming that the corresponding step was involved in the inhibitory mechanism of this compound. Together, these results provide evidence that a cell-based assay system established in this study can be used to screen the agents that target the late stage of HIV-1 life cycle.

Key Words: HIV, Complementation, Anti-AIDS agents, Screening

서 론

후천성면역결핍증 (Acquired Immunodeficiency Syndrom, AIDS)을 일으키는 인체면역결핍바이러스 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)는 인류 보건에 큰 위협이 되고 있다 (1,13). HIV는 다른

접수 : 2000년 9월 1일, 논문게재확정 : 2000년 9월 18일

*; Corresponding author: 박진서, 강원도 춘천시 옥천동 1번지, 한림대학교 유전공학과

Tel: 033-240-1468, Fax: 033-256-3420, E-mail: jinpark@sun.hallym.ac.kr

retrovirus 처럼 바이러스의 유전자가 숙주세포의 유전자에 삽입되어 지속적으로 감염된 상태로 유지되는 특징을 갖고 있다. 따라서 바이러스는 숙주세포의 운명과 같이 한다 (18). 그러므로 삽입된 바이러스의 유전자만 선택적으로 환자의 모든 감염된 세포의 유전자로부터 제거시키기 어렵기 때문에 절대적인 치료제를 개발하기가 대단히

어려운 실정이다. 그럼에도 불구하고 AIDS 바이러스의 감염을 미연에 방지하는 예방법 뿐만 아니라 HIV에 이미 감염된 환자를 치료하기 위한 치료 방법을 개발하는 것이 중요하다.

HIV-1 유전자 (genome)는 약 9.5 Kb (kilobase)로 모든 retrovirus에 공통으로 존재하는 3가지 주요 유전자인 *gag*, *pol*과 *env*를 갖고 있고 바이러스의 복제에 필요한 구조 단백질과 기능 단백질을 합성한다. 이외에도 바이러스 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자를 갖고 있다 (8,18) (Figure 1A). HIV-1의 생활환은 전기와 후기로 나눌 수 있다. 전기는 바이러스가 숙주세포에 흡착 (attachment), 투과 (penetration), uncoating하는 과정, 역전사과정 그리고 숙주세포의 유전자에 삽입 (integration)되는 과정으로 구성된다. 후기는 proviral DNA의 전사와 번역, 그리고 바이러스 조립과정 (budding과 성숙과정을 포함하는)으로 구성된다 (3). 바이러스 복제의 각 단계는 바이러스 증식을 억제할 수 있는 저해제의 개발을 위한 목표물로 간주되고 있고 각 단계를 억제할 수 있는 많은 약제가 개발되고 있다 (2,7,16).

현재까지 HIV 감염을 치료하기 위해 여러 가지 항바이러스 제제가 개발되었지만 임상적으로 그 효용성이 증명되어 환자의 치료에 쓰이는 저해제는 극히 제한되어 있고 많은 약제가 심각한 독성을 갖고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 여러 가지 약제를 복합적으로 사용하는 방법이 연구되고 있다. 이러한 복합적 치료 방법은 각 약제의 독성을 감소시키고 항바이러스 효능을 증진시킬 것으로 간주되고 있다. 게다가 이러한 방법은 약제에 대한 내성을 가진 바이러스의 출현을 최소화시키거나 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다 (5,6,14,15). 최근에 AIDS 치료에 있어 여러 가지 종류의 항바이러스 제제를 복합적으로 사용하는 것이 효과적인 바이러스 증식 억제 효과를 가져온다는 실험 결과는 임상적으로 여러 가지 저해제를 복합적으로 사용하여 치료 전략을 세우는 가능성이 제시되고 있다 (7). 또한 이미 개발된 HIV-1의 저해제에 대해 내성을 가진 바이러스의 출현은 이미 개발된 저해제 이외에도 더 많은 종류의 저해제 개발의 필요성을 강조한다 (14,15). 따라서 향후 개발될 약제와 기존에 개발된 약제를 복합적 치료 전략에 이용한다면 AIDS 질병을 치료할 수 있는 항바이러스 제제의 효능면에서 더욱 증진된 효과가 기대된다.

본 연구에서는 세포배양을 통해 일회성으로 감염을 할 수 있는 재조합 HIV-1 바이러스를 생산하여 이 바이러스가 T 세포를 감염할 때 특정물질에 의해 감염이 저해되는 정도를 정량적으로 분석할 수 있는 방법으로 바이러스 복제환 중 후기 단계 특히 바이러스 조립 및 성숙 단계를 대상으로 유효물질을 검색하는데 사용될 수 있는 HIV-1 complementation system을 개발하여 그 특징과 응용 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. Gag-Pol 및 Env 유전자 발현 벡터 제조

Gag-Pol 유전자 발현 벡터인 pCMVGP의 제조 방법은 이미 박에 의하여 기술되었다 (9). 간단히 기술하면 pCMV Δ p1 Δ envpA로부터 *gag*, *pol* 유전자와 *env* 유전자 일부를 함유하는 *Bam*HI 절편을 정제하여 *Bam*HI으로 처리된 linearized pBluescript KSII(+) (Stratagene)에 ligation시켜 얻은 벡터를 pKSBamHI이라고 하였다 (12). 이 pKSBamHI으로부터 *Nde*I 절편을 제거하였다. *Nde*I 절편이 제거된 pKSBamHI으로부터 *Bam*HI 절편을 분리하여 *Bam*HI 절편이 제거된 pCMV Δ p1 Δ envpA로 cloning시켜 최종적인 Gag-Pol 발현 벡터를 제조하였다.

Env 유전자 발현 벡터인 pLTRENVCAT은 다음과 같이 제조되었다 (9,17). pSVC21CAT으로부터 *gag*와 *pol* 유전자를 함유하고 있는 *Sac*I-*Sal*I 절편을 분리하여 *Sac*I-*Sal*I으로 처리된 pBluescript KSII(-)로 subcloning 하였다. 이렇게 얻은 것을 pKSII *Sac*I-*Sal*I이라고 하였다. 이 벡터를 *Cla*I으로 처리하고 T4 DNA polymerase를 이용하여 만들어진 blunt end에 *Sal*I linker (8 mer)를 ligation시켰다. 얻어진 벡터로부터 *gag*와 *pol* 유전자를 포함하는 *Sal*I 절편을 제거하였다. *Sal*I 절편이 제거된 pKSII*Sac*I-*Sal*I으로부터 *Bss*HIII-*Sal*I 절편을 정제하여 *Bss*HIII-*Sal*I 절편이 제거된 pSVC21CAT으로 cloning시켜 *env* 및 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 유전자 발현 벡터를 제조하였다. 이 벡터를 pLTRENVCAT이라 명명하였다.

2. Transfection 과정

항생제와 10% fetal calf serum이 보강된 Dulbecco's modified Eagle's medium에 COS-1 세포를 배양하였다. HIV-1 바이러스 단백질을 발현하는 벡

터를 DEAE-Dextran method를 이용하여 원숭이 신장세포인 COS-1 세포로 transfection시켰다. 100 mm 조직 배양 용기에 존재하는 2×10^6 세포에 배양 배지 ml 당 5 μg DNA와 500 μg DEAE-dextran (분자량, 500,000 Da)을 이용하여 DNA를 transfection시켰다. DNA-DEAE-dextran 혼합물로 세포를 3시간 동안 배양 후 세포를 chloroquine (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 완전배지에서 2시간 동안 배양하였다. 그리고 세포를 2분간 10% dimethyl sulfoxide에서 충격을 준 후 DMEM으로 세척하고 완전배지를 첨가하여 48시간 동안 37°C에서 배양하였다 (10,11).

3. 역전사 효소 활성 측정

HIV-1 바이러스 단백질을 발현하는 벡터로 transfection된 세포배양액 1.2 ml을 eppendorf tube에 넣어 1000 x rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후 상등액을 다시 저온실에서 15,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리 시켰다. 상등액을 제거한 후 10 μl RT suspension buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM Dithiothreitol (DTT), 20% glycerol, 0.25 M KCl, 0.25% Triton X-100)에 용해시키고 3번의 freezing-thawing 과정을 거친 후 40 μl RT assay mixture (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 7.5 mM MgCl_2 , 0.05% Triton X-100, 5 mM DTT, 1.25 μg poly(A) oligo(dT)와 [^3H]ITP)를 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Ion exchange paper filter (Whatman DE81)을 이용하여 반응액을 여과하였다. 반응액을 여과한 filter를 즉시 2 x SSC buffer에 넣고 10 분씩 3차례 세척하였다. 그리고 95% ethanol로 10 초씩 2번 세척한 후 건조시켜 filter의 radioactivity를 측정하였다 (9).

4. 감염과정

감염에 사용되는 바이러스를 회수하기 24시간 전에 COS-1 세포배양액을 새 배지로 교환하였다. Transfection한 후 약 72시간이 지난 시기에 COS-1 세포배양의 상등액을 회수하여 여과 (pore size, 0.45 μm ; Millipore) 하였다. 상등액에 존재하는 reverse transcriptase의 활성을 위에서도 같이 측정하였다. Reverse transcriptase 활성도가 50,000 cpm에 해당되는 상등액에 1×10^6 Jurkat T 세포를 일정 시간 배양시켰다. 배양 후 세포를 ml 당 1~3 $\times 10^5$ 세포 농도로 조정하여 일정 기간 배양하여 실험을 진행하였다 (4,9).

5. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 활성 측정

감염이 된 세포배양액으로부터 Jurkat T 세포를 1.5 ml eppendorf tube로 옮긴 후 원심분리로 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 1 ml PBS로 세척하고 250 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 μl 에 suspension시켰다. 세포를 용해시키기 위하여 3번의 freezing (-70°C)과 thawing (37°C)을 수행한 후 eppendorf 원심분리기에서 10분간 회전시켜 세포잔재를 제거하고 모아진 상등액 중 60 μl 을 취하여 CAT 분석을 실시하였다. 60 μl 상등액에 CAT mixture (acetyl CoA 8 mg, ^{14}C -chloramphenicol 60 μl , H₂O 54 μl) 5 μl 을 첨가하여 잘 혼합하여 1시간 동안 반응시킨 후 500 μl ethylacetate를 첨가하여 반응을 정지시키고 eppendorf 원심분리기에서 1분간 회전시켰다. 유기용매상에 존재하는 상등액을 새로운 eppendorf tube로 옮긴 후 건조시켰다. 얻어진 pellets에 ethylacetate 20 μl 을 넣어 용해시킨 다음 thin layer chromatography (TLC) plate에 옮긴 후 chloroform (19 volume)과 methanol (1 volume) 혼합물로 1시간 동안 포화시킨 용기에 넣어 TLC chromatography를 20분간 수행하였다. 반응이 끝난 TLC plate를 건조시켜 X-ray film에 하루 동안 노출시켰다. 방사선 동위원소의 활성이 Phosphorimager system (Molecular Dynamics)으로 정량화 되었다 (4,17).

6. Western blot 분석법

준비된 세포 단백질을 SDS-12% polyacrylamide gel에서 분리한 다음, nitrocellulose paper로 단백질들을 옮기고, 비특이적 결합을 감소시키기 위해 paper를 blocking solution에 soaking시켰다. 감지하고자 하는 항원의 항체 용액에 paper를 담가 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, blocking solution으로 여러 번 세척한 다음, alkaline phosphatase로 표지된 이차 항체와 상온에서 약 1시간 동안 반응시켰다. 항체와 반응하고 있는 항원은 BCIP/NBT를 기질로 하여 반응시켜 감지하고, 더 이상의 효소 반응은 20 mM EDTA를 사용하여 중단시켰다.

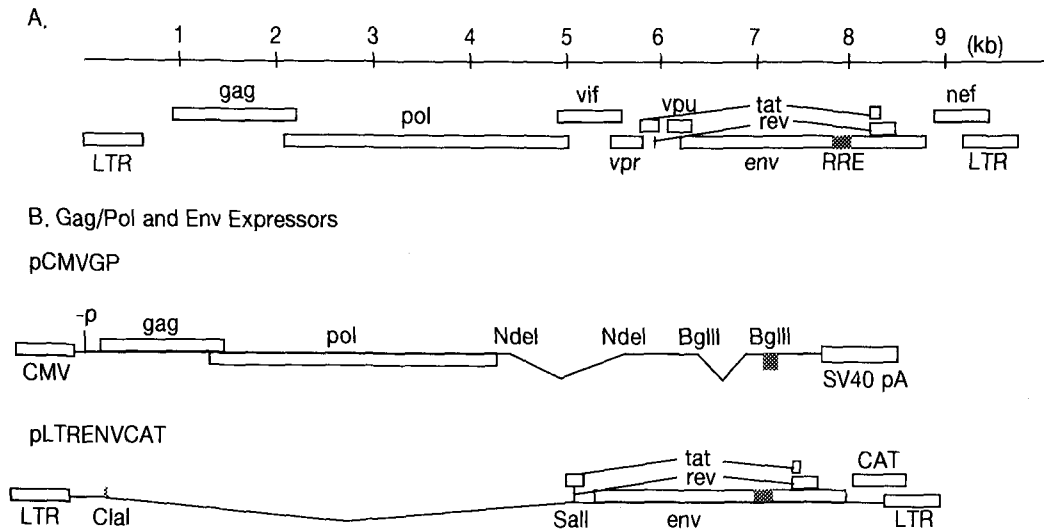


Figure 1. (A) Complete HIV-1 proviral genome. The organization of the HIV-1 proviral genome is shown with the relevant genes. (B) Schematic representation of HIV-1 protein expressing plasmids used in the single-round infection assay. pCMVGP and pLTRENVCAT were constructed as described in the text.

결 과

1. HIV-1 Gag-Pol/Env 발현 벡터 및 HIV-1 Complementation System의 특징

본 연구에서 이용된 HIV-1 바이러스 단백질 발현 벡터는 두개의 다른 벡터로 분리되어 제조되었으며 각각 pCMVGP와 pLTRENVCAT으로 명명되었다 (Figure 1). pCMVGP는 pCMV Δ P1 Δ envpA (12)의 *NdeI* 절편을 제거함으로써 얻었다. pCMVGP는 HIV-1 5' LTR 대신에 CMV promoter를 갖고 있고 SV40 polyA signal을 함유하고 있다. 또한 이 벡터에는 packaging signal로 알려진 19 bp가 제거되어 있다 (Figure 1B). pCMV Δ P1 Δ envpA를 이용한 실험에서 envelope 발현 벡터와의 조합 (recombination)에 의하여 복제 가능한 바이러스가 생산되었다 (9). 이러한 조합 가능성을 억제하기 위하여 pCMV Δ P1 Δ envpA로부터 *tat*과 *rev*의 첫 exon과 *env* 유전자의 일부를 포함하는 유전자 부위를 제거하여 pCMVGP를 제조하였다. 또한 이 벡터는 Rev에 반응하는 cis-acting sequences를 갖고 있다. 그러므로 Gag/Gag-Pol 생산은 HIV-1 Rev가 존재하여야 가능하다. 이 벡터는 바이러스 형성에 필요한 Gag/Gag-Pol 단백질을 제공하지만 이들 유전자는 packaging signal이 결여되어 있으며

로 바이러스 입자로 들어가지 못한다.

pLTRENVCAT 벡터는 감염력이 있는 CAT 유전자를 갖고 있는 HIV-1 provirus인 pSVC21로부터 대부분의 Gag와 Pol 유전자를 포함하는 *Clat-SalI* 절편을 제거하여 Envelope 유전자 발현 벡터로 제조되었고 Gag와 Gag-Pol 단백질의 생산에 필요한 Tat과 Rev 기능, 그리고 Envelope 당단백질을 제공한다 (Figure 1B). 이 벡터는 5'과 3' 양 LTR과 packaging signal을 갖고 있어 바이러스 입자로 들어갈 것이다. 그러므로 reporter 유전자인 CAT 유전자는 감염과정을 통하여 CD4⁺ T 세포로 전달될 것이다. 그런 다음 CAT이 Tat과 Rev 단백질의 조절을 받아서 CD4⁺ T 세포에서 발현될 것이다.

HIV-1 complementation system을 통해 생산되는 바이러스 입자는 감염에 필요한 구조 단백질과 기능 단백질을 갖고 있으므로 CD4⁺ T 세포를 1차 감염시킬 수 있는 능력을 보존하고 있지만 복제기능에 필요한 유전자가 결핍되어 있어 다음 단계의 감염을 진행시킬 수 없다. 그러나 원하는 CAT 유전자를 선택적으로 CD4⁺ T 세포에 발현시킬 수 있기 때문에 특정한 성분이 바이러스 감염을 억제할 수 있다면 CD4⁺ T 세포에서 발현되는 CAT 활성에 저하를 가져올 수 있다 (Figure 2). 이 system의 특성을 요약하면 다음과 같다. 바이러스 생활환의 후기에 해당되는 단계에 작용하는

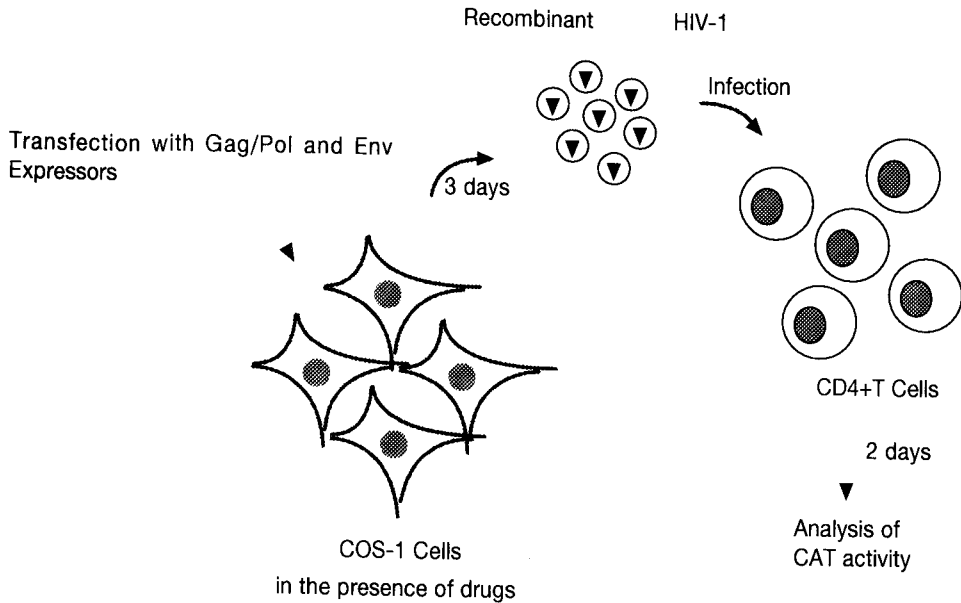


Figure 2. Schematic representation of the single-round infection assay for targeting the late stage of HIV-1 replication. Recombinant HIV-1 virions were produced from COS-1 cells cotransfected with pCMVGP and pLTRENV-CAT plasmids in the absence or presence of drugs. Inhibition of viral infection in CD4+ T cells can be measured by the CAT assay.

저해제 검색을 위한 분석법을 개발하기 위하여 일회성으로 감염을 할 수 있는 recombinant HIV-1 virion을 생산할 때 세포배양액에 특정물질이 존재하도록 하여 이 조건에서 생산된 바이러스가 특정물질에 의하여 변형될 수 있다. 이 바이러스가 T 세포를 감염할 때 특정물질에 의해 감염이 저해되는 정도를 정량적으로 분석할 수 있는 방법으로 바이러스 복제환 중 후기 단계 (전사, 번역, 조립, 및 방출)를 대상으로 유효물질을 검색하는 것이 주된 원리이다.

2. HIV-1 감염을 억제하는 저해제의 존재하에서 감염에 필요한 바이러스 입자의 생산

CD4⁺ 세포를 일회성으로 감염시킬 수 있는 HIV-1 바이러스 입자를 생산하기 위하여 pCMVGP 과 pLTRENV-CAT 벡터를 일정 비율로 조정하여 COS-1 세포로 cotransfection시켰다. Transfection 후 24시간이 지나서 transfection된 COS-1 세포를 일정 농도의 protease inhibitor가 함유된 세포배양액에서 배양하였다. test compound인 protease inhibitor Ritonavir의 존재하에서 48시간과 72시간 사이에서 COS-1 세포로부터 생산된 바이러스 입자를 포함하는 세포배양액을 회수하였다. 원심분

리를 통하여 배양액에 존재하는 바이러스 입자를 분리하여 입자에 함유된 reverse transcriptase 활성을 분석하였다. Ritonavir를 첨가하지 않은 조건에서 대체적으로 transfection된 COS-1 세포의 배양액 1 ml 당 약 40,000~50,000 cpm에 해당되는 reverse transcriptase 활성이 측정되었다.

3. 일회성 바이러스 감염을 통하여 감염 억제 정도 분석

Transfection된 COS-1 세포에서 바이러스가 생성되는 단계는 바이러스 생활환의 후기에 해당되므로 특정물질이 후기에 해당되는 단계에 영향을 미친다면 생성된 바이러스 입자의 감염력에 변화를 줄 것이다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 일회성 바이러스 감염을 통하여 감염 억제 정도를 다음과 같이 분석하였다. Protease inhibitor Ritonavir의 존재하에서 CD4⁺ T 세포를 일회성으로 감염할 수 있고, CAT 유전자를 갖고 있는 바이러스 입자를 함유하는 COS-1 세포배양의 상등액을 회수하여 여과한 후 reverse transcriptase 활성도가 약 50,000 cpm에 해당되는 상등액에 1×10^6 Jurkat T 세포를 일정 시간 배양시켰다. 배양 후 Jurkat T 세포를 ml 당 $1 \sim 3 \times 10^5$ 세포 농도로 조정

하여 2일간 배양한 후 Jurkat T 세포를 회수하여 세포내에 존재하는 CAT 활성을 분석하였다 (Figure 3). 약제를 처리하지 않고 생산한 바이러스 입자로 감염시킨 세포에서의 CAT 활성에 비해 protease inhibitor인 Ritonavir를 처리하여 생산한 바이러스 입자로 감염시킨 세포에서 CAT 활성이 현저히 저하되었고 농도 의존적으로 점진적인 CAT 활성 저하 현상이 관찰되었다.

Phosphorimager를 이용하여 각 반응물질의 방사선 동위원소의 활성을 측정하여 CAT 활성도를 정량하였다. 약제를 처리하지 않고 감염시킨 세포에서의 CAT 활성도를 기준 (100%)으로 정하여 다른 세포에서 측정된 CAT 활성도를 상대적으로 표시하였다. CAT 활성도를 통하여 protease inhibitor인 Ritonavir 성분의 각 농도에 따른 바이러스 감염 억제 효과를 비교한 결과는 Figure 4에 나타난 바와 같다. Protease inhibitor인 Ritonavir의 농도가 100 μM 에서 0.1 μM 에 이르는 범위에서는 효율적으로 바이러스 감염 억제 효과가 나타났으나 reverse transcriptase inhibitor인 AZT의 농도가 50 μM 에 해당되는 조건에서 관찰된 감염 억제 효과는 뚜렷치 않게 나타났다. 이러한 결과는 본 분석법이 바이러스 생활환의 후기 단계에 해당되는 과정을 선택적으로 분석할 수 있다는 것을 나타낸다.

4. HIV-1 protease의 기질인 Gag polyprotein의 분해과정에 대한 protease inhibitor의 효과 분석

HIV-1 protease에 의한 Gag polyprotein의 분해 과정에 대한 protease inhibitor Ritonavir의 효과를 분석하기 위하여 HIV-1 바이러스 단백질을 발현하는 벡터를 COS-1 세포로 transfection시켰다. Transfection 48시간 후에 세포 배지에 protease inhibitor Ritonavir를 여러 농도로 24시간 동안 첨가하여 protease에 의한 Gag polyprotein의 분해 억제 효과를 AIDS patient serum을 이용한 Western blot을 이용하여 분석하였다.

Gag polyprotein과 protease를 발현하는 벡터로 transfection된 세포에 protease inhibitor Ritonavir를 여러 농도로 처리한 후 세포를 회수하여 HIV-1 Gag 단백질의 유형을 AIDS patient serum을 이용하여 생성물을 분석하여 Gag 단백질의 발현 유무 및 분해 정도를 확인한 결과는 Figure 5와 같다. HIV-1 Gag 단백질의 발현은 보통 Gag polyprotein의 전구체로 발현된 후 protease의 작용에 의하여 p24, 17, p9 등의 mature product로 분해된다 (8,18). 따라서 본 실험에서 발현된 단백질의 유형을 살펴보면 protease의 작용이 올바르게 되었는지 혹은 억제되었는지 분석이 가능하다. Ritonavir를 처리하지 않고 배양된 세포에서 발현된 단백질은 전

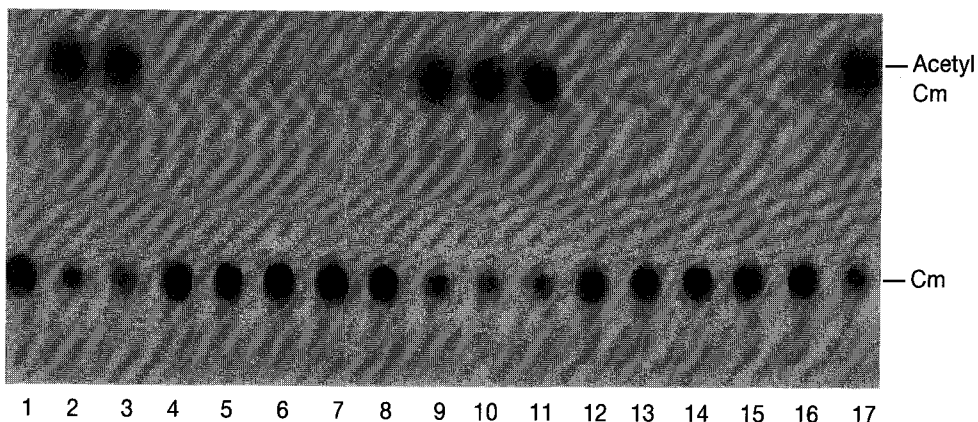


Figure 3. Inhibitory effects of a protease inhibitor on single round infection of recombinant HIV-1 virions for targeting the late stage of HIV-1 replication. COS-1 cells cotransfected with pCMVGP and pLTRENVCAAT were incubated with indicated reagents at the concentrations shown 24 h posttransfection. Supernatants from COS-1 cells cotransfected with pCMVGP and pLTRENVCAAT were incubated with Jurkat cells, and CAT activity was measured. The level of CAT activity reflects various degrees of inhibition of HIV-1 infection. Lanes: 1, uninfected; 2~3, no protease inhibitor; 4~8, addition of protease inhibitor Ritonavir to the culture at 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 μM ; 9, addition of RT inhibitor AZT to the culture at 50 μM ; 10~17, duplicate of lane 2~9. Cm; chloramphenicol, acetyl Cm; 3-acetyl chloramphenicol.

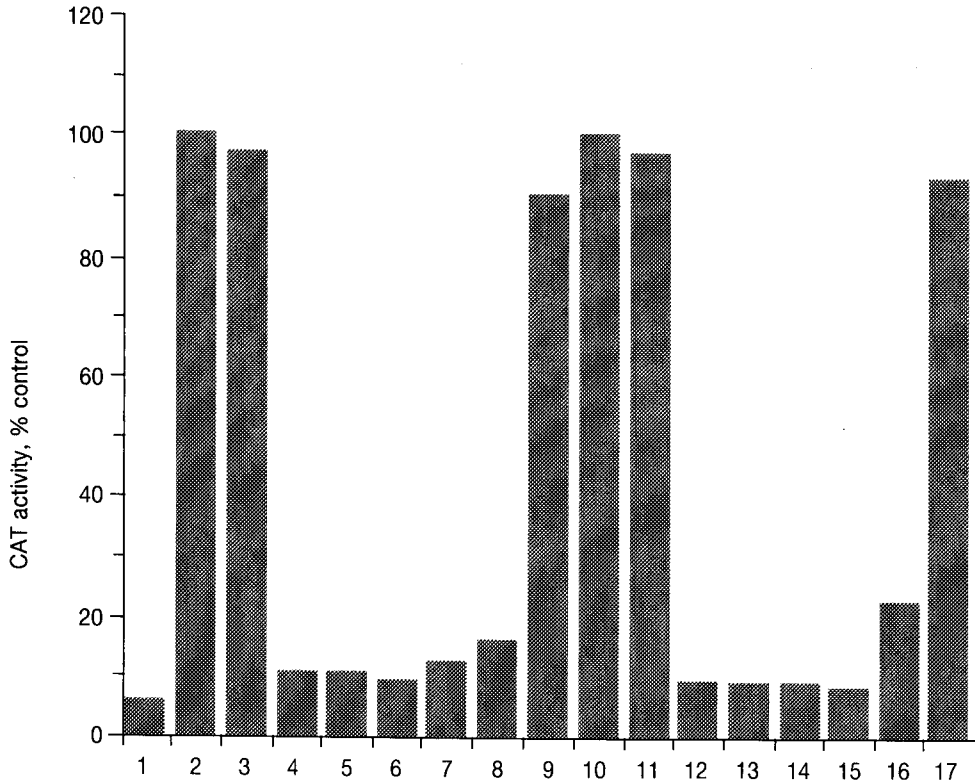


Figure 4. Relative CAT activity in Jurkat cell lysates. Values of results in Figure 3 are expressed as percentage of CAT activity of control cultures infected with recombinant HIV-1 virions without treatment by reagents (taken as 100%). Bars: 1, uninfected; 2~3, no protease inhibitor; 4~8, addition of protease inhibitor Ritonavir to the culture at 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 μM ; 9, addition of RT inhibitor AZT to the culture at 50 μM ; 10~17, duplicate of lane 2~9.

구체 형태의 Gag polyprotein 대부분이 mature product로 분해되었음이 p24의 존재로 확인되었다. 반면에 Ritonavir를 처리하고 배양된 세포에서 발현된 단백질의 유형을 살펴보면 Ritonavir의 농도가 높을수록 Gag 전구체의 상태로 존재하고 낮아질수록 mature product의 생성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이에 비하여 protease 활성 효과가 없는 RT inhibitor인 AZT를 처리하였을 경우에는 Ritonavir를 처리하지 않고 배양된 세포에서 발현된 단백질의 유형과 같이 p24의 생성이 뚜렷하였다 (Figure 5). 이러한 실험 결과는 protease inhibitor인 Ritonavir가 효율적으로 Gag 전구체를 분해하는 protease의 활성을 억제한다는 것을 나타낸다.

고 찰

HIV-1 유전자 (genome)는 바이러스의 복제에

필요한 구조 단백질과 기능 단백질을 합성하는 여러 가지 유전자로 구성되어 있다. 이외에도 바이러스 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자를 갖고 있다 (8,18). 많은 유전자는 HIV-1 바이러스가 매우 복잡한 생활환을 갖도록 한다. HIV-1의 생활환은 크게 전기와 후기로 나눌 수 있는데 전기는 바이러스가 숙주세포에 흡착 (attachment), 투과 (penetration), uncoating하는 과정, 역전사과정 그리고 숙주세포의 유전자에 삽입 (integration)되는 과정으로 구성된다. 후기는 proviral DNA의 전사와 번역, 그리고 바이러스 조립과정 (budding과 maturation)으로 구성된다 (3). 현재 임상에 이용되도록 허용된 약제는 reverse transcriptase나 protease 같은 HIV에 특이한 복제 효소에 대한 저해제로 국한되지만 이외에도 여러 가지 단계에서 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 약제가 개발될 수 있다 (2,7).

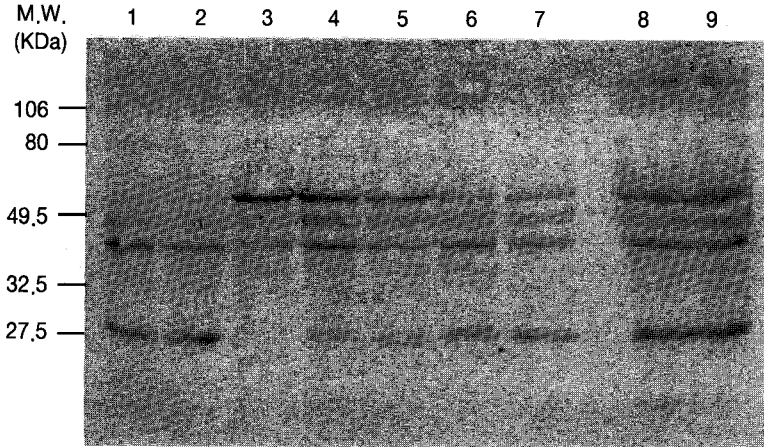


Figure 5. Inhibitory effects of a protease inhibitor on HIV-1 Gag polyprotein processing by HIV-1 protease. COS-1 cells transfected with pGagPr were incubated with indicated reagents at the concentrations shown 24 h posttransfection (10,11). The transfected COS-1 cells treated with protease inhibitor Ritonavir were harvested and Western blotting was performed on cell lysates of transfected cells, using AIDS patient serum. The molecular weight size standards are noted to the left of immunoblot. The unprocessed Gag polyprotein (p55) and the cleavage products (p24) are indicated to the right of immunoblot. Lanes: 1~2, no protease inhibitor; 3~7, addition of protease inhibitor to the culture at 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 μM ; 8~9, addition of RT inhibitor AZT to the culture at 10, and 1 μM .

AIDS와 관련하여 AIDS 바이러스 증식을 억제할 수 있는 저해제를 탐색할 수 있는 연구는 실험 방법이나 시설, 안전성 등의 제반 문제점으로 인하여 극히 제한되고 있다. 또한 AIDS 바이러스는 구조 유전자와 여러 가지 조절 유전자를 갖고 있으므로 감염세포에서 복잡한 생활환을 나타내고 있고 여러 단계의 복제과정을 통하여 증식한다 (Figure 1). 그러므로 연속적으로 감염력이 있는 AIDS 바이러스 입자를 이용한 연구에서 바이러스 복제 저해 효과를 보이는 특정성분의 작용 기작을 명확히 규명하기가 어렵다. 본 연구에서 일회성으로 면역세포인 CD4^+ T 세포를 감염하는 재조합 AIDS 바이러스를 생산하는 HIV-1 complementation system을 이용하여 세포배양을 통해 바이러스 생활환의 후기 단계에 해당되는 과정에서 작용하여 바이러스 증식을 억제할 수 있는 약제를 검색할 수 있는 방법을 개발하였다.

본 연구에서 사용되는 HIV-1 complementation system은 다음과 같이 두 가지 성분으로 구성되어 있다 (Figure 1). 첫째, Gag-Pol 유전자 발현 벡터인 pCMVGP vector는 바이러스 형성에 필요한 Gag와 Pol 단백질을 생산하여 바이러스 입자를 만들지만 packaging signal이 결손되어 있으므로 이들 유전자는 바이러스 입자로 들어가지 않는다.

둘째, Envelope 유전자 발현 벡터인 pLTRENVCA1T는 바이러스 감염에 필요한 Envelope 당단백질과 reporter 유전자인 CAT 유전자를 발현한다. 그러므로 HIV-1 complementation system을 통해 생산되는 바이러스 입자는 감염에 필요한 구조 단백질과 기능 단백질을 갖고 있으므로 CD4^+ T 세포를 1차 감염시킬 수 있는 능력을 보존하고 있지만 복제기능에 필요한 유전자가 결핍되어 있어 다음 단계의 감염을 진행시킬 수 없다. 그러나 원하는 CAT 유전자를 선택적으로 CD4^+ T 세포에 발현시킬 수 있기 때문에 특정한 성분이 바이러스 감염을 억제할 수 있다면 CD4^+ T 세포에서 발현되는 CAT 활성에 저하를 가져올 수 있다 (Figure 2). 본 연구에서는 바이러스 생활환의 후기에 해당되는 단계에 작용하는 저해제 검색을 위한 분석법을 개발하기 위하여 일회성으로 감염을 할 수 있는 recombinant HIV-1 virion을 생산할 때 세포배양액에 표준물질로 protease inhibitor를 첨가하여 이 조건에서 재조합 HIV-1 바이러스를 생산하였다. 따라서 protease inhibitor에 의하여 영향을 받은 바이러스가 T 세포를 감염할 때 감염이 저해되는 정도를 정량적으로 분석한 결과 protease inhibitor의 농도가 증가됨에 따라 감염이 억제됨을 관찰하였다 (Figure 3, 4).

위에서 살펴본 바와 같이 본 연구에서는 바이러스의 생활환 후기 단계를 목표로 HIV-1의 복제를 억제할 수 있는 저해제를 효과적으로 탐색할 수 있는 기술을 이용하여 HIV-1의 복제를 억제시키는 저해제를 개발할 수 있는 가능성을 제시하였다. 특히 바이러스 생활환의 후기에 해당되는 단계에 작용하는 저해제 검색을 위한 분석법의 원리는 일회성으로 감염을 할 수 있는 재조합 HIV-1 바이러스를 생산할 때 세포배양액에 특정물질이 존재하도록 하여 이 조건에서 생산된 바이러스가 특정물질에 의하여 변형될 수 있다는 점에 착안하여 이 바이러스가 T 세포를 감염할 때 특정물질에 의해 감염이 저해되는 정도를 정량적으로 분석하여 바이러스 복제환 중 후기 단계 (전사, 번역, 조립, 및 방출)를 대상으로 유효물질을 검색할 수 있도록 개발한 것이다 (3,8). 본 연구 결과는 바이러스 생활환의 후기를 대상으로 한 바이러스 감염 억제 효과가 있는 물질을 검색하기 위하여 개발된 HIV-1 complementation system은 응용성과 신뢰성을 가지고 있음을 보여 주는 것이다. 이러한 기술은 AIDS 바이러스의 감염을 억제하는 물질의 검색을 안전하고 효율적으로 수행할 수 있도록 바탕을 제공하고 있다.

감사의 글

본 연구는 보건 의료 기술 연구 개발 사업 (HMP-96-D-1-1004) 지원에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Ray F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux F, Rozenbaum W, Montagnier L: Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871, 1983.
- 2) Connolly KJ, Hammer SM: Antiretroviral therapy: reverse transcriptase inhibition. *Antimicro Agents Chemother* **36**: 245-254, 1992.
- 3) Gelderblom HR: Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**: 617-638, 1991.
- 4) Helseth E, Kowalski M, Gabudza D, Olshevsky U, Haseltine W, Sodroski J: Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J Virol* **64**: 2416-2420, 1991.
- 5) Larder BA, Kemp SD: Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **246**: 1155-1158, 1989.
- 6) Larder BA, Darby G, Richman RD: HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**: 1731-1734, 1989.
- 7) Mitsuya H, Yarchoan R, Kageyama S, Broder S: Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. *FASEB J* **5**: 2369-2380, 1991.
- 8) Morrow CD, Park J, Wakefield JK: Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol* **266**: C1135-C1156, 1994.
- 9) Park J: Development and utilization of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based retroviral vector system to express HIV-1 envelope glycoprotein in CD4⁺ T cells. *J Kor Soc Virol* **26**: 141-150, 1996.
- 10) Park J, Morrow CD: Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J Virol* **65**: 5111-5117, 1991.
- 11) Park J, Morrow CD: The nonmyristylated Pr160^{gag-pol} polyprotein of human immunodeficiency type 1 interacts with Pr55^{gag} and is incorporated into viruslike particles. *J Virol* **66**: 6304-6313, 1992.
- 12) Parolin C, Dorfman T, Palu G, Gottlinger H, Sodroski J: Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol* **68**: 3888-3895, 1994.
- 13) Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC: Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**: 497-500, 1984.

- 14) **Richman D:** Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* **37:** 1207-1213, 1993.
 - 15) **St Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, Bach MC, Vavro CL, King DM, Kellam P, Kimp SD, Larder BA:** Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **253:** 1557-1559, 1991.
 - 16) **Stone D:** HIV protease inhibitors head to market. *Biotechnol* **13:** 940-941, 1995.
 - 17) **Terwilliger EF, Godin B, Sodroski JG, Haseltine WA:** Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that expresses the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **86:** 3857-3861, 1989.
 - 18) **Vaishnav YN, Wong-Staal F:** The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* **60:** 577-630, 1991.
-