

성인 T세포 백혈병 바이러스(HTLV-I)의 Ribosomal Frameshifting기구

남 석 현

아주대학교 생물학과

서 론

Retrovirus라 함은 reverse transcriptase containing oncovirus에서 유래한 것으로 RNA 의존성 DNA 합성효소(역전사효소)의 활성을 바이러스 입자에 보유하고 있는 RNA 바이러스를 말하며 조류나 포유류의 악성종양을 일으키는 병인바이러스로서 분리 보고되었다. Retrovirus는 RNA를 유전물질로서 보유하는 바이러스이지만 바이러스 입자의 RNA 자신은 progeny virus의 유전물질을 위한 복제나 바이러스 입자를 조립하는데 필요한 단백질합성에 직접 참여하지 못하고 내재성 역전사효소의 활성에 의해 RNA를 주형으로 이중사 DNA를 합성한 다음, 기주세포의 염색체속에 provirus의 형태로 삽입된다. 그 후, 기주세포의 RNA polymerase II의 활성을 빌어 mRNA를 합성하게 되는데 생성된 mRNA의 일부는 progeny virus의 유전물질로, 그리고 다른 일부는 바이러스 입자의 구축에 필요한 단백질합성에 참여하게 된다. 이상 설명한 바와 같이 retrovirus는 역전사효소의 작용에 의해 일단 RNA에서 DNA로 유전물질이 전환되는 것이 바이러스의 생활환 유지에 필수적인 과정으로 보고되어 있다. 분자생물학의 발전과 더불어 각종 retrovirus의 감염세포로부터 provirus의 DNA 클로닝이 가능하게 되어 retrovirus의 genome 구조가 확실히 알려지게 되었다. 지금까지 클로닝된 증식 가능한(replication competent) retrovirus는 기본적으로 3개의 구조유전자를 보유하고 있으며 provirus의 5'과 3' 말단에 염기서열이 동일한 long terminal repeat(LTR) 사이에 *gag*, *pol*, *env* 유전자가 이 순서대로 배열되

어 있다. *gag* 유전자는 바이러스의 capsid를 구성하는 단백질을 코드하는 유전자이며 *pol* 유전자는 역전사효소를 코드한다. *env* 유전자는 바이러스 입자의 외층에 스파이크상으로 존재하는 당단백질을 코드하는데 *env* 단백질이 retrovirus의 기주특이성을 결정하는 경우가 많다. Provirus를 주형으로 mRNA가 합성될 때 2종류의 분자량이 다른 mRNA가 생성되는데 그 중에서 provirus의 전체 길이에 상당하는 것을 genomic RNA라 하며, RNA splicing에 의해 *gag*와 *pol* 유전자 영역이 탈락된 것을 subgenomic RNA라 한다. *gag*와 *pol* 유전자 산물은 genomic RNA에서 번역되는 것으로 보고되어 있으나 retrovirus의 genome 구조를 보면 *pol* 유전자의 발현을 위해서는 *gag* 유전자의 개시코돈에서 시작된 단백질합성이 *pol* 유전자의 stop codon까지 계속되어야 하며 이를 위해서는 *gag*에서 *pol* 영역으로 read through 할 수 있는 특수한 분자기구가 필요할 것으로 생각된다(12). 여기서는 human retrovirus인 성인 T세포 백혈병 바이러스(human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I)을 모델로 하여 retrovirus의 구조단백질의 생합성을 조절하는 분자기구에 대해 간단히 소개하고자 한다.

1. 각종 retrovirus의 genome 구조 및 유전자의 발현기구

바이러스 입자를 구성하는 주단백질인 *gag*와 *env* 단백질 이외에도 입자에는 바이러스의 증식 및 기주세포에의 감염성을 획득하기 위해 효소단백질이 존재하는데 특히 virion의 감염성 유지에 필요한 것이 virus의 protease이다. Protease는 *gag*의 전구체 단백질을 capsid 형성에 필요한 저분자의 성숙형 단백질로 processing 시키는데

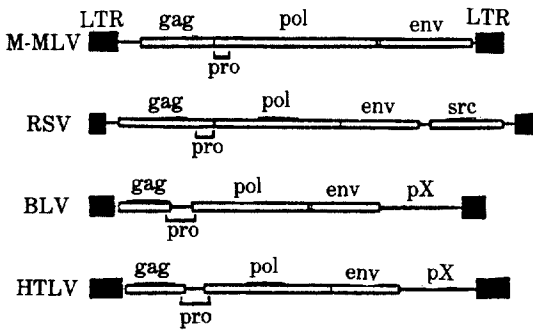


Fig. 1. Comparison of the genomic structures of retroviruses.

필요한 효소로서, 각 retrovirus는 역전사효소나 protease를 생성시키기 위해 Fig. 1에서 도시한 것 같은 방법을 이용하고 있다. 즉, murine leukemia virus (MuLV)의 경우 gag, protease, 역전사효소를 코드하는 유전자는 전부 in-frame의 형태로 구성되어 있어 gag와 pro 및 pol 유전자는 gag의 stop codon에 의해 구분되어 있을 뿐으로 일정빈도로 tRNA^{Gln}의 suppression이 일어나 protease 및 역전사효소가 발현된다(11, 14). Rous sarcoma virus (RSV)의 경우, 역전사효소의 발현을 위해서는 MuLV와는 다른 발현기구가 요구된다. 왜냐하면 pol 유전자의 reading frame은 gag 유전자에 대해 -1의 codon phase를 갖기 때문에 gag 유전자의 3' 영역에서 ribosome의 slipping에 의해 codon phase의 변동이 일어나야만 한다. 실제로 무세포 단백질합성계를 이용한 실험결과 ribosome에서 단백질의 연장단계 중 frameshifting이 일어나 pol 유전자가 발현됨이 증명되었다(3, 9). 후천성 면역부전증(AIDS)의 병인바이러스로 주목되는 human immunodeficiency virus(HIV)의 경우 gag, pro, pol 유전자의 배열상은 MuLV와 비슷하나 viral enzyme의 발현에는 반드시 한번의 frameshifting이 필요하다는 점에서는 RSV와 유사점이 있다(5). 이들보다 훨씬 복잡한 genome 구조를 가지는 것이 mouse mammary tumor virus(MMTV) 및 HTLV-I을 대표로 하는 HTLV family retrovirus들로서 gag, pro, pol 유전자는 각각 서로 다른 reading frame의 codon phase를 가지기 때문에 pol 유

전자의 발현에는 -1방향의 연속적인 두번의 ribosomal frameshifting이 요구될 것으로 보인다(4, 7, 8).

2. HTLV-I protease(pro) 유전자의 발현기구

HTLV-I의 protease 유전자의 발현에는 gag 유전자의 3' 말단영역에서 -1방향의 reading frame의 변동이 번역 중인 ribosome 상에서 일어나는 것이 필수적임을 증명하지 않으면 안된다. 그러나 HTLV-I의 경우, 바이러스의 증식이 RSV나 MuLV와 같이 활발하지 않기 때문에 HTLV-I의 지속감염 세포주를 이용하더라도 pulse label and chase의 방법에 의해 virus 단백질의 생합성기구를 추적하는 것은 무리일 것으로 생각된다. 실제로 HTLV-I의 지속감염 세포 내에서도 RSV나 MuLV의 감염세포내에서 관찰되는 160 kDa 상당의 역전사효소의 전구체 단백질이 검출되지 않고 있다. 따라서 protease의 생합성기구를 분명히 하기 위해서 발현 vector 계를 이용하는 것이 바람직할 것으로 보여져 본 연구에서는 gag와 pro의 open reading frame(ORF)을 포함한 DNA 영역을 vaccinia virus의 7.5 kDa promoter의 하류에 삽입시켜 배양세포내에서의 발현을 꾀하였다. 결과, 53 kDa의 gag 전구체 단백질이 소량 잔류하는 것을 제외하고는 대부분이 3종류의 저분자의 gag 성숙형 단백질로 processing 되었음을 알 수 있어 protease 유전자가 발현되었다는 사실을 간접적으로 알 수 있었다. 특히 vaccinia virus 발현 vector 계에서는 mRNA의 splicing에 의한 유전자 발현기구는 존재하지 않는 것으로 보고되어 있어 protease 유전자의 발현은 ribosomal frameshifting에 의한 것임을 알 수 있다. HTLV-I의 gag 유전자와 protease 유전자가 중복하는 영역 및 그 주변 염기서열에 주목하면 6개의 A 염기가 연속적으로 존재하는 서열이 관찰되는데 이는 prokaryote에서의 frameshifting signal과 유사한 형태를 갖는다(1). 특히 adenine의 homopolymeric sequence의 하류영역은 G, C가 풍부한 영역으로 mRNA가 G-C pairing에 의해 stem-loop 구조를 형성할 가능성이 매우 높다(10). 따라서 stem-loop 구조에 의해 ribosome의 pausing이 일어나 homopolymeric

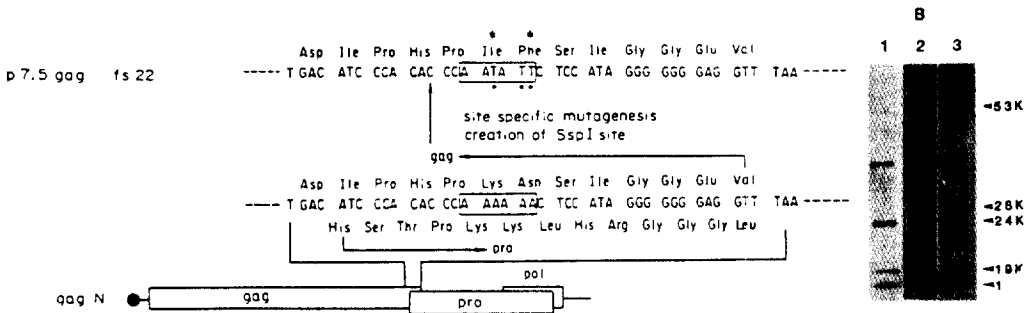


Fig. 2. Abolition of the correct processing of *gag* precursor polyprotein by blocking the frameshift event for the synthesis of HTLV-I protease. (A) Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis for generating p7.5 *gag* fs19. The box encloses six consecutive adenine residues presumably involved in a frameshift event for synthesis of HTLV-I protease. Symbols: •, nucleotide transitions resulting from oligonucleotide-directed site specific mutagenesis; *, exchanged amino acid codon caused by transition of nucleotides; ●, 7.5 K gene promoter of vaccinia virus. (B) The extracts, prepared from cell transfected with p7.5 *gag* N (lane 2) and p7.5 *gag* fs22 (lane 1), were analyzed on an SDS-12% polyacrylamide gel, and subsequent Western blotting analysis was carried out with mixed anti-*gag* monoclonal antibodies. *gag*-related proteins synthesized in MT-2 cells were also analyzed under the same conditions (lane 3).

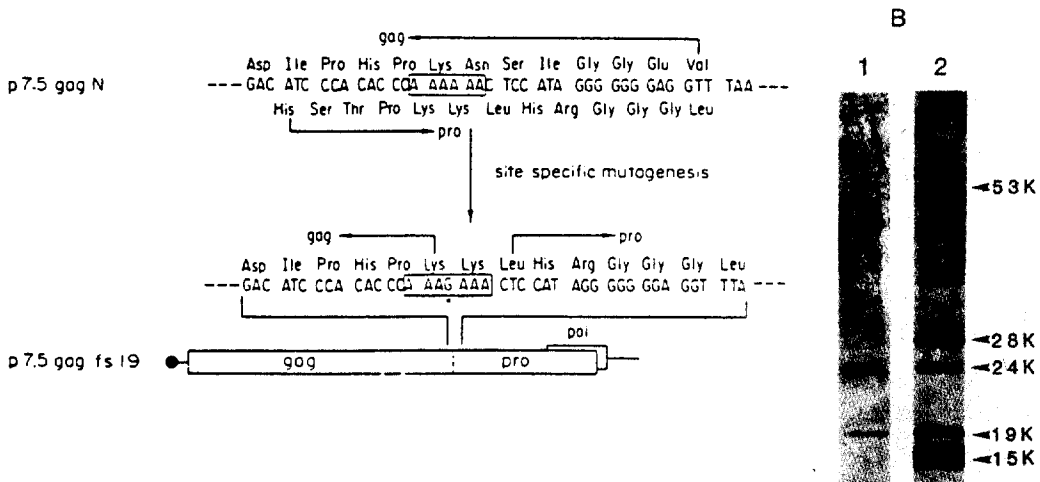


Fig. 3. (A) Correctly processed *gag* proteins were generated from the *gag*-protease fusion protein. The box encloses six consecutive adenine residues of possible frameshift site for synthesis of *gag*-*pro* fusion protein. symbols: ●, one nucleotide insertion introduced by oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis; ●, junction between the *gag* and protease-coding sequence in the fusion protein. (B) Proteins expressed from p7.5 *gag* fs19 was separated on an SDS-12% polyacrylamide gel, and then Western blotting analysis was carried out with mixed anti-*gag* monoclonal antibodies (lane 1). MT-2 cell lysate was used as the marker to show the migration pattern of the authentic mature *gag* proteins of HTLV-I (lane 2).

sequence에서 tRNA가 triplet codon을 인식하는데 혼란이 발생하여 결국 -1방향의 frameshifting이 일어날 가능성이 매우 높다. 이를 증명하기 위하여 homopolymeric sequence를 *in vitro* mutagenesis에 의해 일부 염기를 T로 치

환시켰다. 이 조작에 의해 *gag* 및 *pro* 유전자의 codon phase는 변하지 않았지만 *gag* 전구체의 processing은 일어나지 않았다(Fig. 2). 이것은 아마도 homopolymeric sequence가 없어진 관계로 ribosomal frameshifting이 일어나지 못하

여 *gag*의 개시코돈에서 시작된 translation이 *gag*의 stop codon에서 전부 종결되어 protease가 생성되지 못하였음을 의미한다. 만일 ribosomal frameshifting에 의해 protease가 발현된다면 *gag*와 protease의 융합단백질이 생성될 것이 기대된다. 그러나 이미 기술한 바와 같이 지속감염 세포내에서도 76 kDa으로 추정되는 분자량을 가진 *gag*-protease 융합단백질은 검출되지 않았는데 다음의 두 가지를 그 이유로서 들 수 있다. 첫째, HTLV-I의 증식능력이 약한 관계로 다량의 *gag* 단백질이 합성되지 못하는 것과 더불어 frameshifting의 frequency가 낮아서 생성된 *gag*-protease 융합단백질의 양이 실험적으로 검출 가능한 한계 이하라는 것, 둘째, frameshifting frequency에는 관계없이 생성된 융합단백질이 자체의 내재성 protease의 활성화에 의해 생성 즉시 단백질분해가 일어나기 때문에 결과적으로 검출 가능한 만큼 *gag*-protease 융합단백질이 축적되지 못한다는 가능성도 있다. 조사된 바에 의하면 retrovirus의 protease는 aspartyl protease와 생화학적 특징이 비슷하다는 실험결과가 보고되어 있기 때문에 pepsin에서 관찰된 것 같은 효소 전구체에서 활성형 효소로의 자기분해 기구가 retrovirus의 protease 생합성에 적용될 가능성이 매우 크다(6). 그러나 첫번째 가능성도 부정할 수 없으므로 다음 단계의 실험을 행하였다. A의 homopolymeric sequence 내부에 1염기를 삽입시켜 *gag*와 protease의 ORF를 in-frame의 상태로 조작하였다. 아마도 여기서 유래되는 *gag*-protease 융합단백질은 *in vivo*에서 생성되는 단백질과 동일하다고는 볼 수 없지만 분자구조가 매우 유사할 것으로 생각된다. Mutagenesis에 의해 생성된 융합단백질도 protease에 의해 완전히 processing 되었으며 기대했던 전구체 단백질의 축적은 관찰되지 않았다(Fig. 3). 이 결과에 의해 HTLV-I의 protease는 *gag*-protease 융합단백질의 형태로 생합성된 후 생성 즉시 내재성 protease의 활성화에 의해 자기분해를 일으켜 전구체 단백질로부터 성숙형 protease를 분리시키고 있음을 알 수 있게 되었다. *gag*-protease 융합단백질이 초기단계에서 실

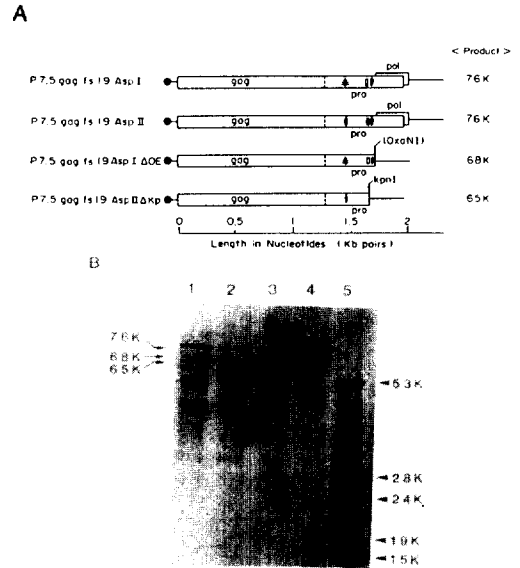


Fig. 4. Identification of 76 K *gag*-protease fusion protein. (A) Schematic representation of the mutant plasmids which express *gag*-protease fusion proteins. Symbols: ●, 7.5 K gene promoter of vaccinia virus; ●, two conserved amino acid stretches between the retroviral proteases and the cellular enzyme group of aspartyl protease; □, short amino acid residues conserved only among HTLV-family retroviral proteases; ◆ or ⊕ in vitro-mutagenized amino acid residues described in Fig. 6A; |, junction between the *gag* and protease-coding sequences in fusion proteins; —, pUC DNA sequence. (B) Analysis *gag*-protease fusion proteins expressed from the mutants by Western blotting. Proteins extracted from transfected cell with p7.5 *gag* fs19 AspI (lane 1), p7.5 *gag* fs19 AspII (lane 2), p7.5 *gag* fs19 AspI OE (lane 3), and p7.5 *gag* fs19 AspII Kp (lane 4) were separated on an SDS-12% polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with mixed anti-*gag* monoclonal antibodies of GIN7, NOR1, and FR45. MT-2 cell lysate was used as the marker of authentic mature *gag* proteins (lane 5)

제로 생합성되고 있음을 증명하기 위해 HTLV-I protease의 활성부위에 존재하는 aspartic acid를 glycine으로 치환시킨 mutant를 만들어서 배양세포내에서의 발현을 시도하였다. 예상대로 내재성 protease의 활성을 잃은 *gag*-protease 융합단백질은 processing되지 못하고 전구체 단백질상태로 축적되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 또

한 76 kDa의 gag-protease 융합단백질 이외에 특정의 세포유래 protease에 의해 분해를 받아 생성된 단백질분자는 관찰되지 않았다. 이 결과는 전구체 단백질에서 활성형 protease를 분리시키기 위한 단백질 분해과정은 protease 자신에 의해 수행되고 있으며 특정의 세포유래 protease가 바이러스 protease의 활성화 과정에 관여하고 있지 않음을 시사하는 간접적인 증거라고 하겠다.

결 론

이상 소개한 바와 같이 HTLV-I의 protease는 gag 유전자의 3' 말단과 protease 유전자의 5' 말단이 중복하는 영역에 존재하는 A의 homopolymeric sequence에서 -1방향의 ribosomal frameshift 가 일어나 gag와 protease가 융합된 trans-frame protein이 생성됨을 알았다. 또한 gag-protease 융합단백질은 내재성 protease의 활성화에 의해 활성형 protease가 autocatalysis에 의해 분리된다는 증거도 얻었다. 그러나 ribosome의 slippery sequence인 homopolymeric run 하류에 있는 RNA의 입체구조가 frameshifting의 frequency 결정에 어느 정도 영향을 주는지는 아직 확실치 않고 있으며, 최근 retrovirus가 아니면서도 -1방향의 ribosomal frameshift에 의해 구조유전자가 발현되는 것이 증명된 avian infectious bronchitis virus (IBV)에서 제시된 이중 stem-loop 구조에 의한 RNA tertiary structure가 형성될 것인지도 확실치 않다(2). Retrovirus의 ribosomal frameshift에 의한 유전자 발현기구는 단지 한정된 유전정보를 바이러스 자신이 충분히 이용할 수 있는 이점을 제공하는 것 뿐만 아니라 retrovirus의 입자구축에 필요한 단백질과 바이러스의 증식 및 감염성 유지에 필수적인 효소와의 생성비율을 단백질 번역단계에서 조절함으로써 각 retrovirus 특유의 생활환경에 적응하면서 생활환을 유지시키는데 필수적인 역할을 담당하고 있으리라 생각된다. 지금까지 클로닝된 진핵세포 유전자내에도 ribosomal frameshift가 일어날 가능성이 있는 homopolymeric sequence가 드물기는 하지만 존재하고 있으나

(13), 실제로 생체내에서 ribosomal frameshift에 의해 전혀 새로운 기능을 가진 단백질이 생성될 수 있을가에 대한 판단은 바이러스를 이용한 좀 더 풍부한 분자생물학적 연구의 결과가 축적된 다음에 가능하리라고 본다.

참고문헌

1. Atkins, F., Gesteland, R.F., Reid, B.R. and Anderson, C.W. (1979) *Cell* **18**, 1119-1131.
2. Breierley, I., Diger, P. and Inglis, S.C. (1989) *Cell* **57**, 537-547.
3. Jacks, T. and Varmus, H.E. (1985) *Science* **230**, 1237-1242.
4. Jacks, T., Townsley, K., Varmus, H.E. and Majors, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4298-4302.
5. Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E. (1988) *Nature* **331**, 280-283.
6. Katoh, I., Yasunaga, T., Ikawa, Y. and Yoshinaka, Y. (1987) *Nature* **329**, 654-656.
7. Nam, S.H. and Hatanaka, M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 129-135.
8. Rice, N.R., Stephens, R.M., Burney, A. and Gilden, R.V. (1985) *Virology* **142**, 357-377.
9. Schwartz, D.E., Tizard, R. and Gilbert, W. (1983) *Cell* **32**, 853-869.
10. Shimotonro, K., Takahashi, Y., Shimizu, N., Gojobori, T., Golde, D.W., Chen, I.S.Y., Miwa, M. and Sugimura, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3101-3105.
11. Shinnick, T.M., Lerner, R.A. and Sutcliffe, J.G. (1981) *Nature* **293**, 543-548.
12. Weiss, R., Teich, N. Varmus, H.E. and Coffin, J. (1982) RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory.
13. Wilson, W., Braddock, M., Adams, S.E., Rathjen, P.D., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1988) *Cell* **55**, 1159-1169.
14. Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1618-1622.