

Human T-cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I)에서 RNA 고차구조가 *pol* 유전자의 발현에 필요한 Ribosomal Frameshifting에 미치는 영향

남 석 현

아주대학교 자연과학대학 생명과학과

HTLV-1이 *pol* 유전자산물을 합성하기 위해서는 genome-size mRNA를 번역해 나아가는 ribosome이 -1 방향으로 두차례 frame을 바꾸어야 한다. 우리는 단 한차례의 frameshifting만으로도 많은 양의 Gag-Pro-Pol polyprotein의 합성이 가능하도록 *gag*와 *pro* 유전자의 frame을 연결시킨 mutant RNA를 제작하였다. 이 돌연변이를 이용하여 ribosome의 shift site 하류영역내에 형성이 예상되는 RNA의 이차구조 또는 삼차구조가 -1 frameshifting을 결정하는 인자로서 작용하는지의 여부를 조사하였다. 결손변이주를 해석한 결과 *pro-pol* 중첩영역에서 효율적으로 frameshifting이 일어나기 위해서는 stem-loop가 필수적으로 형성되어야 하지만 pseudoknot의 형성은 그다지 중요하지 않다는 사실을 알았다.

KEY WORDS □ HTLV-1, ribosomal frameshifting, RNA pseudoknot

Retrovirus는 단백질의 번역단계에서 2가지 방법에 의하여 *pol* 유전자에 코드된 단백질의 발현을 조절하고 있다(8). 그중 하나는 Molony murine leukemia virus(Mo-MuLV)에서 관찰된 amber termination codon의 suppression이며 또 하나는 Rous sarcoma virus(RSV)에서 최초로 보고된 -1 방향의 ribosomal frameshifting에 의한 방법이라고 볼 수 있다(5, 23). -1 ribosomal frameshifting에 의해 *pol* 유전자를 발현하는 retrovirus 중에서 HTLV-1나 mouse mammary tumor virus(MMTV)와 같은 바이러스들은 *gag*와 *pol* 유전자 사이에 제3의 open reading frame인 *pro* ORF가 존재하고 있다(4, 12, 13, 19). 이와 같은 retrovirus들의 경우 한차례의 ribosomal frameshifting으로 Protease의 전구체인 Gag-Pro polyprotein이 합성될 수 있지만 reverse transcriptase의 전구체인 Gag-Pro-Pol polyprotein 합성에는 또 한차례의 -1 frameshifting이 일어날 필요가 있다(6, 12). 지금까지의 -1 frameshifting의 발생기작에 관한 연구는 각 유전자간의 중첩영역내에서 ribosome이 reading frame을 바꾸는 자리를 동정하는데 집중되어 왔다. 그 결과 retrovirus의 *gag-pro* 또는 *pro-pol* 중첩영역내에 보존된 염기서열인 X XXY YYZ가 frameshifting에 필요한 RNA의 일차구조이며 여기에서 ribosome의 P-site와 A-site를 차지하는 두개의 이웃한 tRNA가 one nucleotide만큼 5'방향으로 동시에 미끄러진다는 사실이 밝혀졌다(3, 7). 여기서 X란 A, U 또는 G를, Y는 A나 U를 지칭하며 X와 Y는 같은 염기일수도 있다. 그러나 보존된 7개의 nucleotide만으로는 frameshifting이 일어나는데 불충분하다는 사실이 뒤늦게 밝혀짐에 따라 heptanu-

cleotide sequence 하류영역의 RNA 염기서열이 -1 frameshifting에 미치는 역할에 관심이 집중되었다(6). 이 영역의 RNA는 일반적으로 풍부한 G+C의 함량 때문에 열역학적으로 안정한 stem-loop 구조의 형성이 예상되어 왔지만(6, 16, 17), 최근의 연구결과들은 이 영역이 단순한 stem-loop에 그치지 않고 loop를 구성하는 nucleotide의 일부가 하류의 상보적인 염기들과 염기쌍을 이루면서 보다 복잡한 RNA의 3차구조인 pseudoknot을 형성할 가능성을 제시하였다(2). 실제로 RNA virus의 일종인 avian infectious bronchitis coronavirus(IVB)에서 frameshifting site의 하류영역에 이중 stem-loop의 pseudoknot이 형성된다는 사실과 더불어 고차구조의 파괴가 상류지역에서 일어나는 frameshifting을 현저하게 억제한다는 실험적 증거를 얻을 수 있었다(1). 이 결과는 -1 ribosomal frameshift가 일어나기 위해서는 7개의 nucleotided로 구성된 shift site와 더불어 그 하류영역내의 RNA 고차구조가 필수적으로 요구된다는 사실을 암시하였다. 그러나 하류영역내의 RNA 고차구조 형성여부가 ribosomal frameshift의 발생과는 무관한 retrovirus도 있으므로 둘 사이의 관계를 일률적으로 규정지을 수는 없었다(22). 이미 설명한 바와 같이 HTLV-1의 *pro*와 *pol* 유전자에 코드된 각 단백질이 합성되려면 *gag-pro* 또는 *pro-pol* 유전자 중첩영역에서 -1 frameshifting이 일어나야만 한다. HTLV-1의 *gag-pro* 유전자 중첩영역내에서 일어나는 ribosomal frameshifting에 대해서는 이전에 vaccinia virus expression vector를 이용한 실험에 의해 ribosomal frameshifting의 분자기작을 추측케 하는 실험결과를 얻을 수 있었다(14). 그러나 HTLV-

1의 *pro-pol* 유전자 중첩영역에서 일어나는 -1 ribosomal frameshifting의 분자기작에 대해서는 이 영역내에 존재하는 특이한 염기서열인 UUUAAC에서 두 이웃하는 tRNA가 동시에 frameshift를 일으킨다는 *in vitro*의 연구결과만이 있을 뿐 ribosomal frameshift가 일어나는데 필수적인 바이러스 RNA내의 다른 *cis-acting factor*에 대해서는 아직 확실치 연구된 바가 없다(15). HTLV-1의 *pro-pol* 유전자 중첩영역내의 RNA는 이중 stem-loop에 의한 pseudoknot을 형성할 것으로 보여지기 때문에 pseudoknot이 이 부분에서의 ribosomal frameshift 발생에 어느 정도 관여하고 있는지의 여부는 매우 흥미로운 점이 아닐 수 없다. 따라서 본 연구에서는 *pro-pol* 중첩영역내에 존재하는 frameshifting site의 하류영역이 결손된 mutant RNA를 이용하여 RNA의 고차구조 형성이 -1 frameshifting에 미치는 영향을 *in vitro*의 실험계를 통하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 각종 DNA 제한효소와 T4 DNA polymerase, T4 DNA ligase, 그리고 5'이 인산화된 8 nucleotide의 XhoI linker는 New England Biolabs의 시판품을 사용하였다. 합성유전자는 26 nucleotide와 22 nucleotide의 oligonucleotide를 Applied Biosystem사의 automatic DNA synthesizer로 합성한 후 annealing 시켜서 실험에 사용하였다. 각종 플라스미드의 구축과 대량조제를 위한 transformation에는 *E. coli* JM109균주를 사용하였다.

In vitro transcription에 의한 mRNA의 합성

In vitro transcription에는 Triton X-100로 용균시켜서 회수한 *E. coli*의 세포추출물을 2차례의 CsCl-Ethidium bromide 밀도기울기 원심분리를 통하여 순수분리한 ccDNA상태의 플라스미드만을 사용하였다(18). 정제된 플라스미드는 open reading frame의 하류영역을 인식하는 적당한 DNA 제한효소로 완전 소화하여 직선상 DNA로 만든 다음 SP6 RNA polymerase에 의해 37°C에서 60분간의 반응으로 mRNA를 합성하였다. RNA 합성반응에 사용한 시약은 Promega의 SP6 RNA polymerase와 반응 buffer를 제외하고는 전부 Stratagene의 mRNA capping kit를 구입하여 사용하였으며 Stratagene에서 지시한 실험조건에 따라 mRNA를 합성, 정제하였다.

In vitro translation과 immunoprecipitation

무세포단백질 합성반응에 사용된 rabbit reticulocyte lysate는 Promega에서 구입하였다. 상세한 반응 조건 및 제반 반응에 필요한 주의사항들은 제조업자가 제공한 manual을 참조하였다. 간단히 소개하면 *in vitro*에서 합성된 RNA 1 µg을 methionine을 제외한 나머지 19가지 아미노산이 첨가된 rabbit reticulocyte

lysate 및 1 Ci/µl의 [³⁵S]-methionine(Amersham)과 함께 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응종료 후, 조단백질을 monoclonal antibody 및 Protein A-Sepharose(Pharmacia LKB Biotech.)와 섞어서 1X RIPA buffer(50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS)의 조건하에서 4°C, 16시간 동안 incubation하였다. 그 후 바이러스 단백질이 결합된 Sepharose beads를 회수하여 충분히 세척한 다음 1X sample buffer를 넣고 3분간 끓여서 SDS-10% polyacrylamide gel 전기영동에 사용하였다(10). 전기영동이 끝난 gel은 Fluorography로 바이러스 단백질의 합성 양상을 해석하였다.

항체

Gag-Pro-Pol 융합단백질을 immunoprecipitation으로 검출하기 위하여 본 연구에서는 HTLV-1의 P19 gag을 인식하는 monoclonal antibody인 GIN7을 사용하였다. 이 antibody는 P19 gag와 Gag-related polyprotein을 특이적으로 인식할 수 있음이 이미 밝혀져 있다(14, 20).

결과 및 고찰

각종 플라스미드의 구축

실험에 이용한 모든 플라스미드는 pHTfs를 기초로 제작하였다. pHTfs도 일종의 mutant로서 wild-type과 다른 점은 *gag-pro* 중첩영역내의 frameshifting site에 nucleotide 한개의 삽입으로 *gag*와 *pro*의 reading frame의 codon phase가 일치하게 된 결과 단 한편의 -1 frameshifting만으로도 *pol* 유전자가 발현할 수 있게 되었다는 사실이다(14, 15). 우선 pHTfs를 *HincII*와 *HindIII*를 이용하여 완전소화시켜서 *pro-pol* 중첩영역을 포함하는 830 bp의 DNA 단편을 분리하였다. 이 유전자단편을 pUC19의 *SspI*과 *HindIII* site 사이에 삽입시켜서 다음 실험을 위한 중간단계의 DNA 클론인 pRL을 구축하였다. 이 플라스미드를 *StuI*과 *SmaI*으로 절단한 후 다시 self-ligation으로 절단부 사이를 연결시켜서 *pro-pol* 중첩영역내의 170 bp를 제거할 수 있었다. 여기에서 다시 *HincII*와 *ApaI* 처리에 의해 결손이 유발된 DNA 단편을 pHTfs의 *HincII-ApaI*(nt.2198~nt.2784) 사이의 영역과 대체시켜서 *pro-pol* 중첩영역내에 170 bp의 결손이 일어난 mutant 플라스미드인 pHTfsΔM을 구축하였다(Fig. 1, 2). 다시 플라스미드 pRL에서 *TaqI*처리로 분리한 430 bp의 DNA 단편을 pUC19의 *AccI* site에 삽입시켰다. 그 다음 DNA 단편의 삽입방향이 확인된 플라스미드를 *PstI*으로 절단한 후 T4 DNA polymerase 처리와 8 nucleotide의 *XhoI* linker(5'-CCTCGAGG-3')의 부착에 의해 *PstI* site를 *XhoI* site로 바꾼 플라스미드를 제작하였다. 여기에서 *XhoI*과 *Bsu36I* 처리로 170 bp의 DNA 단편을 분리하는 한편, pRL을 8 nucleotide *XhoI*

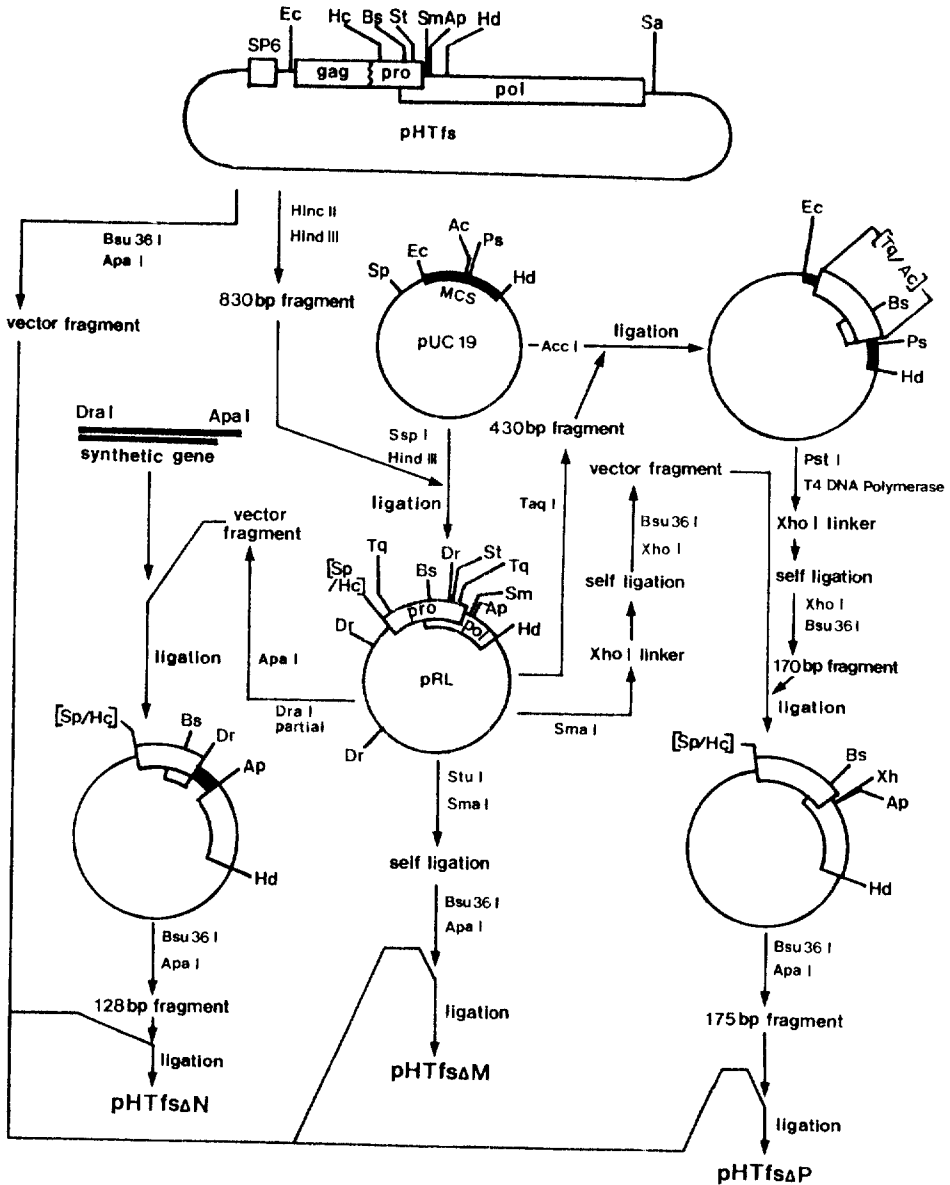


Fig. 1. Schematic diagram for construction of the mutant plasmids termed as pHTfs Δ M, pHTfs Δ N and pHTfs Δ P. Abbreviations: Ac, AccI; Ap, ApaI; Bs, Bsu36I; Dr, DraI; Ec, EcoRI; Hc, HincII; Hd, HindIII; Sa, Sall; Sm, SmaI; Sp, SspI; Tq, TaqI; Xh, XhoI; MCS, multiple cloning site

linker로 *pro-pol* 영역의 *SmaI* site를 *XhoI* site로 바꾼 다음에 다시 *XhoI*과 *Bsu 36I*의 완전소화로 벡터를 포함하는 2.7 kb의 DNA를 분리하였다. 분리된 2.7 kb와 0.17 kb의 DNA단편을 ligation반응으로 연결하여 *TaqI-SmaI*(nt.2655 ~ nt.2781)의 126 bp가 결손된 플라스미드를 제작하였다. 이 플라스미드에서 분리한 *Bsu 36I-ApaI*의 DNA단편을 pHTfs의 wild-type DNA와 대체시켜서 pHTfs Δ P를 구축하였다

(Fig. 1, 2). HIV-1의 frameshifting site를 pHTfs Δ M에 도입시키기 위하여 5'-CCACCTGGAGGCG-TTCTGTA AAA-3'와 5'-TTTACAGAACGCCTCC-AGGTAGGGCC-3'의 oligonucleotides를 annealing시켜서 만든 double strand linker를 pRL의 *pro-pol* 중첩영역 중의 *DraI*(nt.2595)과 *ApaI*(nt.2784) site사이에 도입한 플라스미드를 만든 다음 다시 제한효소 처리에 의하여 *Bsu 36I-ApaI* DNA 단편을

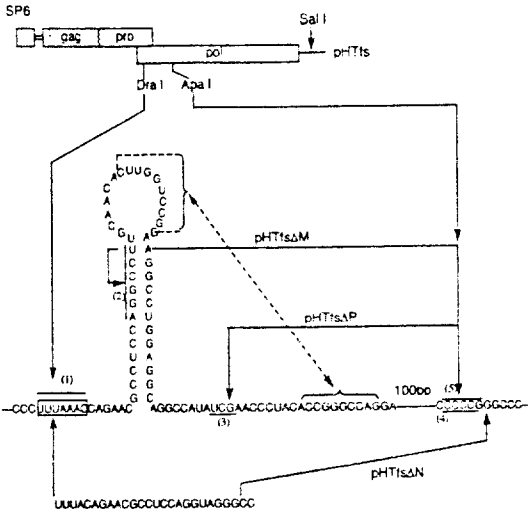


Fig. 2. Nucleotide sequence of a region of HTLV-I mRNA showing the frameshift site (boxed) together with the putative structure and the truncations as well as an insertion in the mutants pHTfsΔM, pHTfsΔP and pHTfsΔN, respectively. The solid lines numbered 1~5 are positions corresponding to the DNA sequences recognized by restriction endonucleases as follows: 1, DraI; 2, SmaI; 3, TaqI; 4, SmaI and 5, ApaI. Dotted lines show the formation of a potential pseudoknot

분리하였다. 이 DNA 단편을 pHTfs내의 wild-type DNA와 대체시켜 pHTfsΔN을 구축하였다(Fig. 1, 2). Cell-free translation계에서 Gag-Pro-Pol 융합단백질의 발현

*In vitro*에서 합성한 종류의 gag-pro-pol mRNA를 무세포 단백질합성계에서 polypeptide 합성의 전령으로 사용한 결과 HTLV-I의 pro나 pol 유전자도 다른 retrovirus들과 마찬가지로 -1 ribosomal frameshifting에 의하여 발현한다는 사실을 알 수 있었다(15). 그러나 pol 유전자의 발현에는 두차례의 ribosomal frameshifting이 필요하기 때문에 Gag-Pro-Pol polyprotein을 검출하는데 기술적인 어려움이 있었다(Fig. 3). 이와 같은 이유로 pro-pol 영역의 mRNA상에서 일어나는 ribosomal frameshifting의 특성을 연구하기 위해서는 gag와 pro의 reading frame이 연결된 mutant인 pHTfs를 이용하여 실험에 사용할 각종 mutant를 구축할 필요가 있다. 이미 보고된 바와 같이 pHTfs에서 생성되는 Gag-Pro polyprotein은 -1 ribosomal frameshifting의 결과 합성된 Gag-Pro trans-frameprotein과 비교할 때 그 아미노산서열에서 약간의 차이가 있을 것으로 예상된다. 그러나 polyprotein이 보유한 본래의 기능에는 전혀 변화가 없음을 볼때 pHTfs가 보유한 mutation이 앞으로의

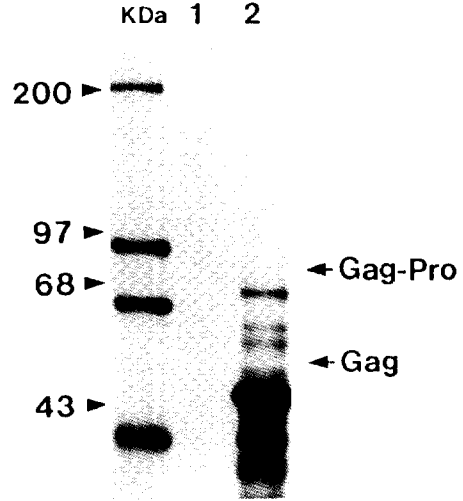


Fig. 3. Fluorogram of [³⁵S] methionine labeled translation products in response to mRNA derived from the plasmid harboring the entire gag, pro and pol ORF in genomic configuration (lane 2) or no RNA (lane 1)

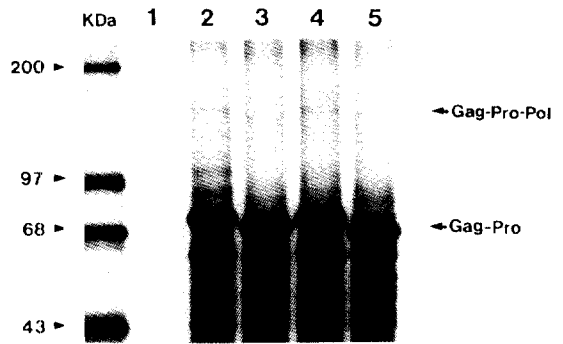


Fig. 4. *In vitro* translation programmed with mRNAs transcribed from pHTfs (lane 2), pHTfsΔM (lane 3), pHTfsΔP (lane 4) and pHTfsΔN (lane 5) or no RNA (lane 1). Polypeptides were subjected to fractionation by SDS-PAGE (10%) after immunoprecipitation

실험에 미칠 영향은 무시해도 좋을 것이다(14). *In vitro* translation의 결과 pHTfs에서 유래한 mutant gag-pro-pol mRNA로부터 76 kDa의 Gag-Pro polyprotein과 더불어 160 kDa의 단백질이 합성되었는데(Fig. 4). 이것은 DNA 염기서열에서 추정된 Gag-Pro-Pol polyprotein과 분자량이 일치할 뿐 아니라 HTLV-I의 protease나 reverse transcriptase를 인식하는 토끼의 항혈청과도 반응하는 것으로 보아 pol 유전자산물의 전구체인 Gag-Pol-Pol polyprotein임이 틀림없다(15). 기대했던 대로 wild-type에서는 거의 검출 불가능했던 Gag-Pro-Pol polyprotein이

mutant의 사용으로 확실히 합성여부를 판단할 수 있게끔 되었으며 ribosomal frameshifting이 일어나는 효율은 약 2~3% 정도라는 사실도 알 수 있었다 (Fig. 3, lane 2 and Fig. 4, lane 2).

-1 ribosomal frameshifting에 미치는 하류영역의 RNA 구조

HTLV-I의 *pro-pol* 중첩영역내의 RNA 염기서열 중에는 ribosomal frameshifting site로 증명된 UUUAAAC 이외에도 그 하류에 G+C가 풍부한 영역이 존재하는 것으로 보아 RNA stem-loop의 형성을 쉽게 예상할 수 있다(Fig. 2). 따라서 RNA stem-loop가 ribosomal frameshifting의 발생기작에서 담당하는 역할을 조사하기 위하여 이미 설명한 mutant인 pHTfs Δ M으로부터 합성한 mRNA를 사용하여 *in vitro* translation을 시행하였다. 그 결과 인위적인 결손에 의하여 160 kDa보다 분자량은 감소하였지만 분명히 Gag-Pro-Pol polyprotein이 합성되었음을 알 수 있었다(Fig. 4, lane 3). 그러나 단백질의 양이 결손돌연변이에 의하여 상당히 감소한 사실로 볼때 ribosomal frameshift가 효율적으로 일어나기 위해서는 하류영역에 RNA stem-loop이 형성되어야 한다는 것을 시사하였다. 그렇지만 MMTV와 같은 거의 완전한 frameshifting의 억제체는 일어나지 않았으므로 미루어(2, 6), HTLV-I의 *pro-pol* ribosomal frameshifting은 7 nucleotide의 frameshifting site만으로도 어느 수준까지는 작동가능한 것으로 생각할 수 있었다. 왜냐하면 mutant RNA내의 결손영역 이외에서 새롭게 stem-loop이 형성될 가능성은 매우 희박하며 인위적인 결손에 의한 *pro* 유전자의 종지 codon의 변화도 ribosomal frameshifting에는 아무런 영향을 주지 못할 것으로 보기 때문이다(1, 7). HTLV-I의 *pro-pol* 중첩영역내에 존재하는 frameshifting site는 IBV의 frameshifting site와 염기서열이 같다. 그 뿐만 아니라 frameshifting site의 하류에 이중 stem-loop로 구성된 RNA pseudoknot이 형성될 것으로 생각되기 때문에 효율적인 ribosomal frameshifting이 일어나기 위해서는 IBV와 마찬가지로 pseudoknot의 존재가 필수적일 가능성이 크다. 이와 같은 가능성을 시험하기 위하여 frameshifting site 하류의 단순 stem-loop를 형성할 수 있는 염기서열은 보존되어 있으나 loop를 구성하는 17 nucleotide중 10 nucleotide에 상보적인 염기들의 결손이 유발되어 pseudoknot의 형성이 불가능한 mutant mRNA를 합성하여 *in vitro*에서 frameshifting의 발생여부를 관찰하였다(Fig. 2). Cell-free translation의 결과, pseudoknot이 형성될 수 없는 경우에도 거의 wild-type과 비슷한 수준의 ribosomal frameshifting이 일어나는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4, lane 4). 이상의 결과는 HTLV-I의 *pro-pol* ribosomal frameshifting의 경우, frameshifting의 유도에 frameshifting site 하류의 단순 stem-loop가 필수적으로 요구되지만

IBV와는 다르게 효율적인 ribosomal frameshifting의 발생에 pseudoknot은 필요하지 않다는 사실을 보여주고 있다. 그러나 stem-loop이 파괴되어도 상당수준의 frameshifting이 일어난다는 점에서는 frameshifting site만으로도 효율적인 ribosomal frameshifting이 일어나는 HIV-I와 유사하다고 하겠다(22). 그렇다면 HIV-I의 frameshifting site가 HTLV-I의 RNA내에서 RNA 고차구조의 도움없이도 HIV-I 본래의 ribosomal frameshifting 효율인 10% 수준대로 reading frame의 switch를 유도할 것인가는 흥미있는 문제가 아닐 수 없다. 이 문제에 대한 답을 얻기 위하여 단순 stem-loop 뿐만 아니라 pseudoknot의 형성이 가능한 염기서열 전부를 결손시킨 pHTfs Δ M 유래의 mutant mRNA에서 frameshifting site인 UUUAAAC의 염기서열을 HIV-I의 frameshifting site인 UUUUUUA로 변경시킨 mutant mRNA를 합성하였다(Fig. 2). 합성된 mRNA로 *in vitro* translation 반응을 실시한 결과 pHTfs Δ M의 경우와 비슷한 분자량을 갖는 Gag-Pro-Pol 융합단백질이 예상대로 검출되었지만 ribosomal frameshifting 효율이 HIV-I의 수준으로 증가하였다는 증거는 찾아볼 수 없었다(Fig. 4, lane 5). 우리는 왜 HIV-I의 frameshifting site가 HTLV-I RNA내에서 본래의 기능을 발휘하지 못하는 지에 대한 질문에 대답할 수 있는 실험결과를 가지고 있지 않다. 그렇지만 retrovirus의 genome-size RNA가 package될 때 RNA의 3차원적 구조가 중요한 것처럼 아마도 전체적인 mRNA의 구조가 ribosomal frameshifting의 효율을 결정하는데 중요한 역할을 담당할지도 모른다. Computer search를 통하여 각종 retrovirus의 *gag-pol* 중첩영역을 조사해 보면 retrovirus들을 frameshift site의 하류영역내에 RNA의 고차구조가 없는 retrovirus군과 고차구조의 형성이 가능한 retrovirus군으로 대별할 수 있음을 알 수 있다. 또한 후자의 경우는 다시 RNA stem-loop의 2차구조가 형성되는 것과 보다 복잡한 3차구조인 pseudoknot이 형성되는 것으로 재분류된다(21). 그러나 본 연구의 대상인 HTLV-I는 pseudoknot의 형성이 충분히 예상되면서도 실제로 이와 같은 RNA의 구조가 ribosomal frameshifting에 별다른 큰 구속력을 갖지않고 있는 것으로 볼때 ribosomal frameshift의 발생에 미치는 pseudoknot의 역할에 대해 보다 세밀히 검토해야할 필요성이 있다고 생각된다. 따라서 pseudoknot의 형성가능성이 시사된 retrovirus들을 대상으로 pseudoknot이 ribosome의 -1 frameshifting 기작에 어떻게 기여하고 있는가에 대한 정확한 지식을 축적해 나아가야할 필요성이 있으며 이와 같은 목적의 일환으로 HTLV-I *pro-pol* 중첩영역의 pseudoknot을 구성하는 각 stem-loop를 destabilization 또는 restabilization시킬 때 나타나는 ribosomal frameshifting의 변화를 *in vitro*에서 조

사할 예정으로 있다.

참 고 문 헌

- Brierly, I., P. Digard and S.C. Inglis. 1989. Characterization of an efficient ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, **57**: 537-547.
- Chamorro, M., N. Parkin and H.E. Varmus. 1992. An RNA pseudoknot and an optimal heptameric shift site are required for highly efficient ribosomal frameshifting on a retroviral messenger RNA. *Proc. Acad. Sci. USA*, **89**: 713-717.
- Hatfield, D. and S. Oroszlan. 1990. The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 186-190.
- Hiramatsu, K., J. Nishida, A. Naito and H. Yoshikura. 1987. Molecular cloning of the closed circular provirus of human T-cell leukemia virus type I: a new open reading frame in the gag-pol region. *J. Gen. Virol.* **68**: 213-218.
- Jacks, T. and H.E. Varmus. 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science*, **230**, 1237-1242.
- Jacks, T., K. Townsley, H.E. Varmus and J. Majors. 1987. Two efficient ribosomal frameshift events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4298-4302.
- Jacks, T., H.D. Madhani, F.R. Masiarz and H.E. Varmus. 1988. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, **55**: 447-458.
- Jacks, T. 1990. Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr. Topic. Microbiol. Immunol.*, **157**: 93-124.
- Krieg, P.A. and D.A. Melton. 1986. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 7057-7070.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Meiton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn and M.R. Green. 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 7035-7056.
- Moore, R., M. Dixon, R. Smith, G. Peters and C. Dickson. 1987. Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two ribosomal frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J. Virol.*, **61**: 480-490.
- Nam, S.H. and M. Hatanaka. 1986. Identification of a protease gene of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) and its structured comparison. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 129-135.
- Nam, S.H., K. Kidokoro, H. Shida and M. Hatanaka. 1988. Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease. *J. Virol.*, **62**: 3718-3728.
- Nam, S.H., T.D. Copeland, M. Hatanaka and S. Oroszlan. 1992. Characterization of ribosomal frameshifting for the expression of pol gene of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *J. Virol.*, (submitted).
- Rice, N.R., R.M. Stephens, A. Burry and R.V. Gilden. 1985. The gag and pol gene of a bovine leukemia virus: Nucleotide sequence and analysis. *Virology*, **142**: 357-377.
- Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohnishi, Y. Ogawa and Y. Ikawa. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 677-681.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1988. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama and M. Yoshida. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3618-3622.
- Tanaka, Y., Y. Koyanagi, T. Chosa, N. Yamamoto and Y. Hinuma. 1986. Monoclonal antibodies reactive with both p28 and p19 of adult T-cell leukemia virus-specific polypeptides. *Gann*, **74**: 327-330.
- Ten Dam, E.B., C.W.A. Pleij and L. Bosch. 1990. RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes*, **4**: 124-136.
- Wilson, W., M. Braddock, S.E. Adams, P.D. Rathjen, S.M. Kingsman and A.J. Kingsman. 1988. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*, **55**: 1159-1169.
- Yoshinaka, Y., I. Katoh, T.D. Copeland and S. Oroszlan. 1985. Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1618-1622.

(Received September 9, 1992)

(Accepted September 23, 1992)

ABSTRACT: Effects of Higher-order RNA Structure on Ribosomal Frameshifting Event for the Expression of *pol* Gene Products of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)

Seok Hyun Nam (Department of Biological Science, College of Natural Science, Ajou University, Suwon 441-749, Korea)

Synthesis of the *pol* gene products of HTLV-1 requires ribosomes to shift frame twice in -1 direction while translating genome-size mRNA. We have made a mutagenized RNA in which the *gag* and *pro* genes are aligned to allow synthesis of a larger amount of the Gag-Pro-Pol polyproteins by a single frameshifting. Using this mutant, we could examine the questions whether the predicted RNA secondary or tertiary structure downstream of the shift site is operative as a determinant for -1 frameshifting. Deletion analysis showed that the stem-loop structure is essential for efficient frameshifting in the *pro-pol* overlap, but formation of a pseudoknot is less important.