Journal of Natural Science
Pai Chai University, Korea
Vol. 10, No. 1: 27~32, 1997

HIV gp41의 세포내 부분과 상호작용하는 단백질 유전자의 분리

김은미, 김정우
배재대학교 생화학과

Isolation of the Gene for HIV-1 gp41 Interacting Protein

Eun Mi Kim, Jung Woo Kim
Department of Biochemistry, Pai-Chai University

HIV-1 gp41의 세포내 부분과 상호작용하는 단백질 유전자를 분리할 목적으로 yeast two hybrid system을 사용하여 검색하였다. 전체 1.4 X 106 colony를 검색하여 최종적으로 20개의 colony를 얻었다. 이들 colony로부터 분리된 유전자의 염기배열을 결정하여 본 결과, acidic ribosomal protein P0, beta tubulin, alpha catenin등의 세가지 종류임을 밝혔다. 이들은 yeast system 내에서 매우 특이적으로 gp41과 상호작용하고 있음을 알았다.

To find the interacting protein with the cytoplasmic domain of HIV-1 gp41, the yeast two hybrid system was used for the expression cloning. Among the 1.4 X 106 colonies, 20 colonies were selected as the final candidate for the interacting protein gene. The nucleotide sequencing revealed three kinds of protein, acidic ribosomal protein P0, beta tubulin, alpha catenin. These proteins interacted with the gp41 specifically in yeast system.

Key words : Yeast two hybrid assay, HIV-1, gp41, Protein-protein interaction

서 론

AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)는 CD4+ T세포의 결핍에 의해 일어나는 증상으로 거의가 HIV 감염에 의해 유발된다. 그러나 HIV가 AIDS의 원인균이라는 사실이 밝혀진지 10 여년이 지난 오늘에도 정확한 HIV와 숙주 세포와의 상호작용에 관한 연구는 아직도 밝혀지지 않은 부분이 많은 실정이다. HIV의 표면 단백질은 전구체인 gp160가 절단되어 gp120와 gp41으로 분리된다. 이 바이러스의 리셉터인 CD4는 표면 단백질인 gp120와 결합하며, gp41은 숙주 세포와 바이러스의 fusion에 관여한다고 알려지고 있으며 이 단백질은 막을 통과하는 transmembrane domain을 함유하고 그 C-terminal은 cytoplasm에 노출되어 있다. 이 HIV gp41의 세포내 부분은 초기의 연구

에서는 그 중요성이 강조되지 않았으나(Berdinger *et al*., 1988; Lee *et al*., 1989), 최근에는 그 중요성이 다음과 같이 부각되고 있는 추세이다. 즉 HIV gp41의 세포내 부분은 HIV 단백질인 Vif 의 존성인 protease의 target이 되며(Guy *et al*., 1991), rapid endocytosis에 관여하고(Rowell *et al*., 1995) 그중 일부의 펩티드는 PKC에 의한 인산화를 억제하기도 하고(Ward *et al*., 1995) 세포막에 구멍을 형성하는데 관여 하기도 하며(Chernomordik *et al*., 1994) fusion시에도 관여하리라 여겨지고 있다(Owens *et al*., 1994). 또한 바이러스의 복제에도 관여할 가능성이 시사되기도 하며(Yu *et al*., 1993) 표면 단백질의 안정성에도 관여하고 있다고 (Gabuzda *et al*., 1992) 보고되고 있다. 바이러스가 감염된 후 새로운 바이러스를 생성하기 위해서는 숙주 세포내에서 바이러스의 여러가지 단백질, RNA 등이 서로 상호작용하여 compact한 구조를 이루어야 하는 assembly 과정을 거쳐야 한다. 그러나, HIV 의 assembly에 관한 분자 수준에서의 기작은 아직 알려지지 않고 있는 실정이다. 표면 단백질 gp41의 세포내 부분은 assembly 과정중에 matrix 단백질과 상호작용하고 있다고 알려지고 있는 정도이며(Freed and Martin, 1995, 1996) 그 과정중에 숙주세포의 어느 단백질과 상호작용하여 어떤 과정으로 새로운 바이러스가 만들어지고 있는 지는 모르는 상태이다. 따라서 본인은 최근 개발된 yeast two hybrid system(Field and Song, 1989; Chien *et al*., 1991; Bartel *et al*., 1993)을 이용하여 gp41의 세포내 부분에 상호작용하는 단백질의 유전자를 분리하려고 하였다. 분리된 유전자의 구조를 분석하여 단백질의 예상되는 기능을 조사함으로서 이 바이러스 단백질의 세포내에서 일어나는 현상을 이해할 수 있으리라 생각되며, 이와같은 기작을 밝힘으로서 새로운 형태의 AIDS 치료제의 개발도 가능하리라 사료된다.

실험재료 및 방법

1. HIV gp41 세포내 부분의 LexA fusion 단백질 발현 yeast 백터의 구축

HIV-1 gp41 세포내 부분과 *LexA*가 fusion된 단백질을 효모에서 발현시킬 수 있는 plasmid를 구축하기 위해 먼저 PCR을 사용하여 gp41의 C-terminal 세포내 부분인 151개의 아미노산에 해당하는 유전자를 얻었다. 말단에 *EcoR1* site가 붙어있는 sense primer (5'- CCGAA TTCAA T AGAG TTAGG CAGGG ATATT C)와 SalIsite가 붙어있는 antisense primer (5'- CCGTC GACTT ATAGC AAAAT CCTTT CCAAGCC)를 HXB2CG를 template로 하여 Amplitaq polymerase (Takara, Inc.)를 이용하여 94도에서 1분, 50도에서 2분, 72도에서 3분의 반응을 30번 반복하여 460 base pair의 DNA 단편을 얻었다. 이것을 *EcoRI*과 *SalI*으로 절단한 후, gel purification을 하고 yeast two hybrid용 백터인 pLex202에 삽입하여 pLex202ENVC를 얻었다.

2. HeLa cDNA library 를 이용한 검색

LexA-ENVC hybrid 단백질이 포함된 EGY48 [*MATa, his3, trp1,ura3-25, leu2::pLex2 leu2 lexAop6/pSH18 34 (LexAop-lacZrepoter)*] yeast strain을 competent cell로 하고 lithium acetate 방법을 이용하여 yeast two hybrid용 HeLa cDNA library를 carrier DNA와 1 : 100의 비율로 섞은 후 transformation 시켰다. 이 cDNA fragment는 pJG4-5의 EcoR I와 Xho I을 이용하여 cloning되어 있고 galactose 존재하에서만 fusion protein이 expression 되도록 Gal1 promoter가 존재하고 있다. 따라서 cDNA가 competent yeast strain에 도입된 transformants는 tryptophan prototrophy (plasmid marker) 성질을 나타내어서 synthetic medium Ura-, His-, Trp-에서 selection이 가능하였다. Synthetic media (Ura-, His-, Trp-)에서 자란 모든 transformants를 havest하여 2% galactose가 포함된 synthetic medium(Ura-, His-, Trp-, Leu-)에 plating하여서 cDNA가 도입되어 LexA-ENVC fusion 단백질과 상호작용하는 효모 세포를 선별하였다.

3. 선별된 효모의 galactose 의존성 조사

선별된 효모세포의 성장이 galactose에 대한 의존성 여부를 다시 보기 위해 2% galactose(inducing condition)가 포함된 synthetic medium(Ura-, His-, Trp-, Leu-)과 2% glucose(non-inducing condition)가 포함된 synthetic medium에 접종하였다. Galactose를 함유하는 배지에서는 잘 성장하고 glucose를 함유하는 배지에서는 성장하지 않는 특징을 나타내는 효모 세포를 선택하여 5-bromo-4-chloro

-3-indolyl-a-galactopyranoside (X-gal)와 2% glu-cose나 2% galactose가 포함된 synthetic medium (Ura-, His-, Trp-)에 streak하여 β-galactosidase의 활성을 조사하였다. 단지 galactose 존재하에서 reporter gene이 발현되는 효모를 선택하여 액체배지에서 키운후 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid를 *E.coli* K12 strain (*KC8pyrF T 5, hsdR, leuB600, trpC9830 lacD74, strA, gslK, hisB436*) 에 transformation해서 M9 minimal medium(Thi+, His+, Ura+, Leu+, Trp-)에서 선택적으로 성장하는 균을 선별하였다. 선별된 *E.coli*를 다시 액체배지에서 키우고 plasmid를 분리하여 그것이 library 유래의 plasmid임을 확인한 후 그 염기서열을 se-quencing하여 결정하였다.

4. 후보 단백질 유전자의 염기서열 결정

염기 서열을 결정하려는 plasmid가 함유되어 있는 *E. coli* colony로 부터 액체배지에 옮겨서 하룻밤을 배양하였다. 다자란 균액 1.5 ml 을 취하여 원심분리하고 상등액을 50 ul 남겨놓고 버린 후 vortex 하였다. TENS buffer(10 mM Tris Cl; pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS)를 첨가 후 3M NaOAc 를 넣고 vortex후 원심분리하였다. 상등액을 새로운 tube로 옮긴 후 100% EtOH 첨가후 원심분리를 하여 DNA를 침전시켰다. 다시 80% EtOH 로 침전을 세척하고 건조시킨 후 RNase가 함유된 물에 녹였다. RNA가 제거된 DNA 약 2-4 ug에 denaturation 용액 (2 M NaOH, 2 mM EDTA)을 가한 후 30 분간 37도에서 반응시켰다. Neutralizing 용액 (3 M NaOAc)으로 중화 시키고 섞은 다음 EtOH을 가하여 침전시키고 70% EtOH로 세척후 건조시키고 물에 녹였다. Denaturation된 DNA 용액에 5X sequencing buffer (USB kit)와 primer를 넣은 다음 65도에서 2분간 반응후 실온에서 10분간 방치하였다. 37도에서 15분간 primer를 annealing 시키고 이 용액에 DTT와 labelling mixture, labelled dATP, sequenase를 가하고 37도에서 5분 반응시켰다. 반응을 끝내도록 ddNTP mixture가 들어있는 tube에 각각 옮기고 37도에서 5분간 처리하였다. 시료 loading buffer를 가하고 80도에서 5분 간 열처리를 하고 1시간 동안 pre run을 한 8 M urea-8% polyacrylamide gel에 apply하여 1500 voltage constant 조건으로 2, 3시간 전기영동하여 분리후 gel을 완전히 말리고 detection 하였다.

결 과

HIV-1 gp41의 세포내부분과 상호작용하는 단백질 유전자를 찾기위하여 yeast two hybrid system을 이용하기위한 백터 pLex202ENVC를 PCR을 사용하여 구축하였으며, 이때 만들어진 백터의 구조를 Fig. 1에 나타내었다.

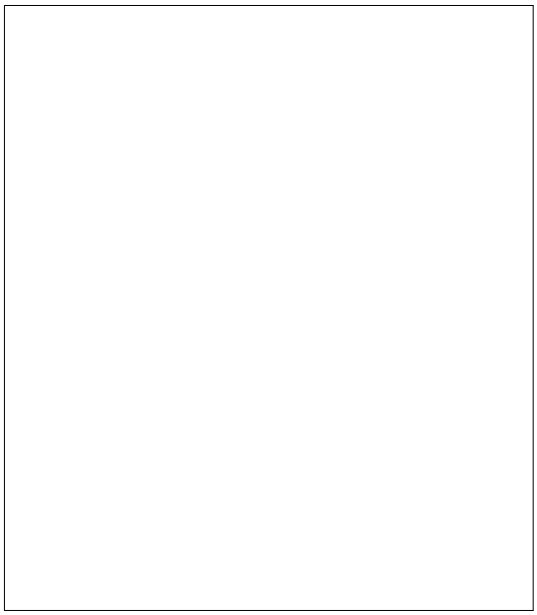

Fig. 1. Construction of pEG202ENVC

리포터 유전자를 갖고 있는 EGY48에 만들어진 plasmid를 transformation하고 Ura-, His-배지에서 얻어진 yeast에 HeLa cDNA library를 다시 transformation하여 140만개의 서로다른 colony를 얻었다. 이들을 수확하여 그 중 140만개 이상의 colony가 생성되도록 수확액을 취하여 galactose 존재하에서 4시간 induction한 후, Ura-, His-, Trp-, Leu- 배지에서 5일간 배양하여 자라나는 colony 532개를 얻었다. 이들을 Ura-, His-, Trp-, X-gal/Gal배지에서 푸른색을 띠고, Ura-, His-, Trp-, X-gal/Glc배지에서는 하얀색을 띠는 colony 20개를 얻었다. 이들 yeast를 glass bead를 사용하여 파괴한 후, plasmid를 분리해내고 다시 pLEX202ENVC가 들어있는 yeast에 transformation하여 얻어진 plasmid에 의해 재현성이 있는지를 확인하

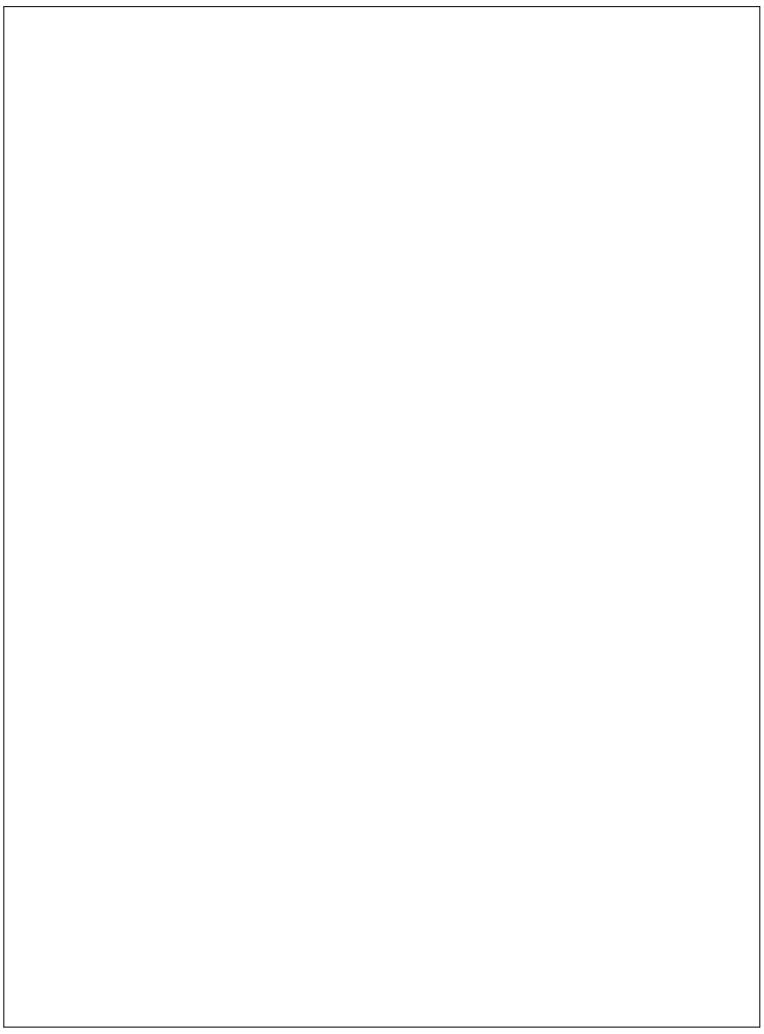

Fig. 2. Nucleotide sequence comparison between the gene for isolated plasmids from the candidate yeast and gene for the homologous proteins

였다. 이들의 염기서열을 결정하여 Fig. 2와 같은 3가지 종류의 plasmid를 얻었으며, 이들이 acidic ribosomal protein P0, beta tubulin, alpha catenin 임을 알았다. 이들의 다른 단백질에 대한 특이성을 조사하기위하여 마우스의 레트로바이러스인MuLV의 표면항원 단백질의 세포내부분과 HIV-1의 리셉터 단백질인 CD4의 세포내 부분들 과 상호작용하는지의 여부를 yeast내에서 조사하였다. 그 결과를 Table 1에 나타내었고, 이들의 상호작용은 HIV-1 gp41의 세포내 부분과 특이적으로 일어나고 있음을 알았다.

고 찰

바이러스가 세포내에서 증폭되어 다시 세포밖으로 나가는 과정동안에 바이러스가 생성하는 단백질과 상호작용하는 세포내 단백질은 많이 존재하리라 예상되고 있으나, 그 정확한 상호작용의 기작은 아직 알려지지 않고 있는 상태이다. 본 실

Table 1. Specificity test of the isolated gene using various bait plasmids

1) Auxotroph test

LexA / B42	UHWL-/Gal				UHWL-/Glc			
	gp41 C-ter	MuLV C-ter	CD4 C-ter	LC1	gp41 C-ter	MuLV C-ter	CD4 C-ter	LC1
#249	+	-	-	-	-	-	-	-
#121	+	-	-	-	-	-	-	-
#317	+	-	-	-	-	-	-	-

+ : growth - : no growth

2) X-gal test

LexA / B42	UHW-/Gal				UHW-/Glc			
	gp41 C-ter	MuLV C-ter	CD4 C-ter	LC1	gp41 C-ter	MuLV C-ter	CD4 C-ter	LC1
#249	blue	white	white	white	white	white	white	white
#121	blue	white	white	white	white	white	white	white
#317	blue	white	white	white	white	white	white	white

험에서는 HIV-1 gp41의 세포내 부분과 상호작용하는 단백질을 yeast two hybrid system을 이용하여 검색하였고, 그결과 몇가지 단백질과 상호작용하고 있음을 제시하였다. 그 중 alpha catenin은 cell adhesion molecule인 cadherin의 세포내부분과 상호작용하고 있는 catenin 복합체중 하나로 actin filament와 연결되어 있다는 것이 알려지고 있다(Ozawa *et a*l., 1989). Cadherin의 세포내부분은 beta catenin과 직접 결합을 하고 있으며, beta catenin이나 plakoglobin에 alpha catenin이 결합하여 cytoskeletal protein에 연결시켜 주고 있는 것으로 알려져 있다(Aberle *et al.*, 1994). 또한 beta tubulin은 microtubule의 구성요소로서 cytoskeletal protein의 하나이며, acidic ribosomal protein P0는 리보소옴의 구성요소 중의 하나이다. 이들과 HIV-1 gp41과의 상호작용이 실제로 생체내에서 일어나는 지는 더 연구 해야하나, 이 논문에서는 그 가능성을 제시하였다는데에 의의가 있다고 생각된다.

참고문헌

Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.*, 107: 3655-3663.

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R., and Fields, S. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In; Hartley, D.A. (ed.): In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach. Oxford University Press. Oxford, pp. 153-179.

Bedinger, P., Moriarty, A., von Borstel, R.C., Donovan, N.J., Steimer, K.S., and Littman, D.R. 1988. Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. *Nature*, 334: 162-165.

Chernomordik, L., Chanturiya, A.N., Suss-Toby, E., Nora, E., and Zimmerberg, J. 1994. An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J. Virol.*, 68: 7115-7123.

Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. 1991. The two-hybrid system:A

method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 88: 9578-9582.

Fields, S., and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-247.

Freed, E.O., and Martin, M.A. 1996. Domains of the human imunodeficiency virus type I matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.*, 70: 341-351.

Freed, E.O., and Martin, M.A. 1995. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type I matrix. *J. Virol.*, 69: 1984-1989.

Gabuzda, D.H., Lever,A., Terwilliger, E., and Sodroski, J. 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type I envelope glcoproteins. *J. Virol.*, 66: 3306-3315.

Guy, B., Geist, M., Dott, K., Spehner, D., Kieny, M.P., and Lecocq, J.P. 1991. A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a Vif-dependent modification of human immunodeficiency virus type I Env protein. *J. Virol.*, 65: 1325-1331.

Lee, S.J., Hu, W., Fisher, A.G., Looney, D.J., Kao, V.F., Mitsuya, H., Ratner, L., and Wong-Staal, F. 1989. Role of the carboxy-terminal protion of the HIV-1 transmembrane protein in viral transmission and cytopathogenicity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 5: 441-449.

Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.*, 8: 1711-1717.

Owens, R.J., Burke, C., and Rose, J.K. 1994. Mutations in the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J. Virol.*, 68: 570-574.

Rowell, J.F., Stanhope, P.E., and Siliciano, R.F. 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.*, 155: 473-488.

Ward, N.E., Gravitt, K.R., and O'Brian, C.A. 1995. Inhibition of protein kinase C by a synthetic peptide corresponding to cytoplasmic domain residues 828-848 of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein. *Cancer Lett.*, 88: 37-40.

Yu, X., Yuan, X., McLane, M.F., Lee, T.H., and Essex, M. 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type I transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.*, 67: 213-221.