

## BHK-21 세포에서의 일본뇌염바이러스 구조단백질에 의한 세포독성

성기민<sup>1</sup> · 정용석\*

경희대학교 생물학과 및 기초과학연구소

일본뇌염바이러스(*Japanese encephalitis virus*, JEV)의 구조단백질 capsid (C), precursor membrane (prM/M), 및 envelop (E) 단백질의 독립적인 발현을 위한 inducible expression system을 구축하였다. 발현세포주로는 BHK-21을 사용하였으며 발현의 induction에는 tetracycline analog인 doxycycline이 사용되었다. Transfectant BHK-21/IV (vector 대조), BHK-21/IC (C), BHK-21/IP (prM/M), 및 BHK-21/IE는 G418과 hygromycin 존재하에 클로닝되었으며 doxycycline induction에 따른 각 유전자의 mRNA 전사를 확인하였다. 세포의 성장곡선, chromatin condensation, internucleosomal DNA fragmentation, 및 flow cytometry에 의한 DNA content profile 분석을 통해 induction에 의한 각 구조단백질의 발현이 숙주세포에 미치는 영향을 조사하였다. 세 transfectants 모두 세포성장률이 감소하고 chromatin이 응축되었다. 그러나 DNA fragmentation 및 DNA content profile 분석에서는 BHK-21/IC만이 induction에 따라 상응하여 반응하였다. 이상의 결과는 JEV 감염에 의한 apoptotic 세포사멸 유도기전에서 capsid 단백질이 직접적이고 독립적인 영향요인이 될 수 있음을 제시한다.

**Key words** □ apoptosis, inducible gene expression, *Japanese encephalitis virus*, structural proteins

일본뇌염바이러스(*Japanese encephalitis virus*, JEV)는 family *Flaviviridae*에 속하며 모기를 매개체로 인간과 동물에 감염하여 높은 치사율을 보이는 병원성 바이러스이다. JEV의 유전자는 약 11 kb의 positive-strand RNA로 이루어져 있으며(1) 5' 말단에는 type I cap이 있으나 3' 말단에는 poly-(A) tail 없이, 보존된 nucleotides CU로 끝맺는다. 유전체는 긴(약 10 kb) 하나의 open reading frame (ORF)과 5' 말단에 99개의 nucleotides, 3' 말단에 약 600 개의 nucleotides의 비전사부위(untranslated regions, UTRs)를 포함하며, ORF에서 발현되는 polyprotein은 해독 중, 혹은 해독 후 숙주세포 또는 바이러스의 단백질분해효소에 의해 절단되어 세 개의 구조단백질(capsid, C; precursor membrane, prM; envelope protein, E)과 일곱 개의 비구조단백질(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)로 성숙된다(3,4).

각 비구조단백질의 기능은 대부분 정확히 밝혀지지는 않았으나, NS1 단백질은 막과 연관되어 있는 당단백질로서 바이러스 복제의 초기단계에 관여할 것으로 추정된다(18). NS3는 단백질분해효소, helicase, triphosphatase의 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 단백질분해효소의 기능에는 NS2B가 보조인자로 작용하는 것으로 보고되었다(7,12). 또한 NS5의 기능으로 RNA중합효소 및 methyltransferase 등이 보고되어 있다(3,4).

바이러스의 감염으로 인한 세포병변효과(cytopathic effects, CPE) 및 세포사멸(apoptosis)의 메커니즘에 대한 연구가 여러 종

류의 바이러스를 이용하여 이뤄지고 있으며, 특히 JEV를 비롯한 많은 바이러스들에서 바이러스 단백질과 apoptosis를 연관하여 활발한 연구가 진행 중이다. 이전의 보고에 의하면, *baculovirus*의 p35, IAP는 세포의 apoptosis를 막는 것으로 알려져 있고, *cytomegalovirus* (CMV)의 IE1, IE2는 p53의 transcriptional activity를 떨어뜨려 세포의 apoptosis를 막는 것으로 보고되어 있다(10,23-24). 반대로 *adenovirus*의 E1A, 12S, 13S 단백질, E3, 그리고 E4 단백질(26), *papilloma virus*의 E2, E7 단백질(5) 등은 감염세포에서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 특히 sindbis virus에 의한 lytic infection은 apoptosis에 의한 것으로 밝혀져 있다(13).

JEV와 같은 family에 속해 있는 *Hepatitis C virus* (HCV)의 경우 core, NS3, NS5 단백질 등은 감염세포의 tumorigenesis를 유도한다는 주장이 보고되어 있고(8,17,20), 또한 JEV의 capsid와 같은 역할을 담당하는 core 단백질은 apoptotic pathway에 관여하여 apoptosis를 유도하거나(19,27), 그것과는 상반되게 TNF receptor로부터 전달되는 pro-apoptotic signal에 저항을 갖도록 세포를 유도한다는 주장도 보고되어 있다(15,17). 한편, JEV 감염에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것이라는 보고가 있었고(14), 이러한 현상은 단순히 세포 배양 시스템에서 뿐 아니라 쥐를 이용한 동물 모델에서도 최근에 확인된 바 있다. 뿐만 아니라, anti-apoptotic 유전자인 *bcl-2*의 과발현으로 JEV 감염에 의한 apoptosis를 저해, 지속감염(persistent infection)을 유도한다는 보고도 있었다(14).

JEV를 비롯하여 다양한 바이러스의 단백질이 숙주세포의 세포 독성 및 생리적 변화에 직접 또는 간접적으로 관여한다고 믿어지나(16), 대부분의 RNA 바이러스에서 어떤 단백질이 세포독성

\*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 02-961-0829, Fax: 02-961-0244

E-mail: ysjeong@khu.ac.kr

<sup>1</sup>Therapiagene Co., 341 Bojung-Ri, Gusung-Eup, Yong-In, Kyunggi-Do, Korea

에 관여하며, 세포의 어떤 단백질과 서로 작용하는지에 대한 정확한 자료는 확보되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 JEV의 구조단백질 유전자를 클로닝하여 BHK-21에서 inducible expression system을 구축하였고 각각의 구조단백질 유전자를 발현시킨 후 나타나는 세포생물학적 변화에 대해 조사하였다.

**재료 및 방법**

**바이러스 및 세포**

실험에 사용된 JEV는 K94P05로써 1994년 한국 완도지방의 일본뇌염모기 *Culex tritaeniorhynchus*에서 분리된 것으로 국립보건원의 신경계 바이러스과로부터 제공받았다. 배양세포주로는 Baby hamster kidney cells (BHK-21)를 사용하였으며, 5%의 fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 첨가된 Eagles' minimal essential medium (MEM)로 0.5% CO<sub>2</sub> 공급과 함께 37°C에서 배양하였다.

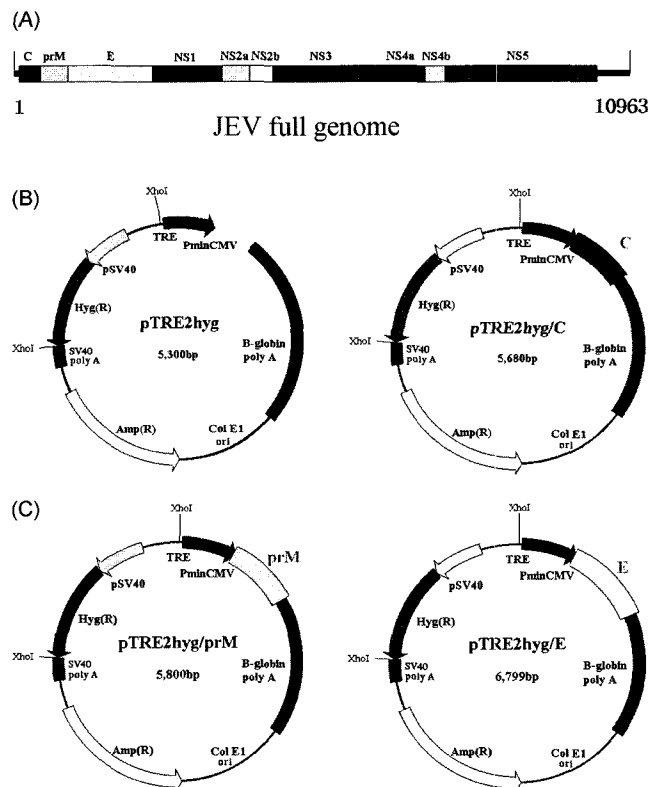
**구조단백질 유전자의 클로닝**

직경 60 mm의 세포배양용기에 세포가 70~80% 정도의 단일층을 형성했을 때 1.0 multiplicity of infection (MOI)의 JEV를 접종, 40 시간 배양한 후 RNA 추출용액(50 mM sodium acetate [pH 5.2], 0.6% SDS, 1 mM EDTA, 60 µg/ml proteinase K)을 가하여 세포를 용혈시켰다(상온, 15 분). 용혈된 세포액은 phenol 및 phenol/chloroform 혼합액으로 처리하여 세포내 total RNA를 분리하고 100% ethanol로 침전, 정제하였다. 증류수에 재부유한 total RNA 용액은 1 U의 RQ 1 DNase (Promega, Madison, USA)를 처리하여 DNA를 완전히 제거하고 ethanol 침전으로 최종 정제되었다.

위 RNA에 25 pM의 random hexamer (Promega)를 섞어 genomic RNA를 변성하였다(95°C 2 분, 4°C 5 분). 여기에 최종적으로 1 mM dNTPs, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>가 되도록 한 후 40 U의 RNasin (Promega)과 200 U의 superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)를 넣고 42°C에서 1~2 시간 동안 반응시켰다. 반응종료 후에는 95°C에서 5 분간 역전사효소를 불활성화 시켰다. JEV의 E, prM, C 유전자를 특이적으로 증폭, inducible expression system의 response vector (pTRE2hyg, Clontech, Palo Alto, USA)에 클로닝하는데 사용된 primer sets는

Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 최종적으로 위의 cDNA 반응용액 10%와 25 pM의 primer 쌍에 3.3× reaction buffer (Perkin Elmer, Norwalk, USA), 1.5 mM dNTPs, 6 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>와 2 U의 *rTth* DNA polymerase (Perkin Elmer)을 넣어 수행하였다. 반응조건은 95°C에서 3 분간 첫 denaturation 후, 95°C 1 분, 45°C 30 초, 72°C 2 분 순서로 30 cycle을 반복한 후, 72°C에서 10 분간 최종 extension을 수행하였다. 생성된 DNA는 0.8%의 저온용융점 agarose gel (Sigma, St. Louis, USA) 전기영동을 이용하여 분리하였다.

분리된 JEV 구조단백질을 코딩하는 DNA는 pGEM T-easy vector (Promega)에 클로닝한 다음, *Bam*HI과 *Sal*I를 사용하여 구



**Fig. 1.** Schematic diagram of cloning strategy. (A) JEV full-length genome. (B) RT-PCR products of JEV structural genes (C, prM/M, E) were cloned into T-easy vector first, and then *Bam*HI/*Sal*I-digested fragments were cloned again into tetracycline response vector, pTRE2hyg (see Materials and Methods).

**Table 1.** Primer sets used in this study

Target genes	primers	Locations in JEV <sup>a</sup>	Sequence(5' → 3') <sup>b</sup>	Restriction site introduced
Capsid	CAP5'	99-111	CGCGGATCCACCATGACTAAAAACCAG	<i>Bam</i> HI
	CAPr2	465-476	ACGCGTCGACCTAGGCTCCGGCATA	<i>Sal</i> I
prM	prM/Mf	477-488	CGCGGATCCACCATGAAGCTATCAAAC	<i>Bam</i> HI
	prM/Mr2	965-976	ACGCGTCGACCTAGGCTCCGGCATA	<i>Sal</i> I
Envelop	Ef	978-989	CGCGGATCCACCATGTTTAACTGTCTG	<i>Bam</i> HI
	Er2	1488-1499	ACGCGCTGACCTAGGCATGCACATT	<i>Sal</i> I

<sup>a</sup>NCBI GenBank accession: locus AF045551

<sup>b</sup>Bold letters represent translation start codons(ATG) or stop codons(CTA)

조단백질 유전자 부위를 잘라내어 pTRE2hyg vector (Clontech)에 다시 클로닝하였다(Fig. 1).

#### Regulation vector (pTet-on)의 transfection

직경 60 mm 배양세포용기의 BHK-21 세포가 40~60% 정도 자랐을 때 transfection을 수행하였다. 상온에서 100  $\mu$ l의 무혈청 (serum-free) MEM과 10  $\mu$ g의 lipofectin (Gibco BRL)을 혼합하여 30~45 분간 배양한 후, 100  $\mu$ l의 무혈청 MEM과 약 2  $\mu$ g의 inducible expression system의 regulation vector, pTet-on vector를 섞은 혼합물과 잘 섞어 15 분간 배양하였다. 이 transfection solution mixture는 무혈청 배지로 씻은 세포에 첨가하여 배양한 후(37°C, 16 시간), 남은 transfection solution mixture를 제거하고 새 MEM (5% FBS, 1% P/S)을 첨가해 48 시간 동안 배양하였다. 재조합 DNA가 도입된 하나의 세포클론을 얻기 위하여 약  $1 \times 10^3$ 의 세포를 96-well 플레이트의 각 첫 well에 seeding 후에 limiting dilution method로 클로닝을 시도하였고, G418 (600  $\mu$ g/ml, Sigma)이 포함된 MEM으로 3 주 이상 배양하여 selection 과정을 수행하였다.

#### Response vector (pTRE2hyg)의 transfection

Regulation vector (pTet-on)의 transfectant에 구조단백질 유전자가 도입된 각 response vectors (pTRE2hyg/E, -/prM, -/C)를 중복하여 transfection시켰다. Transfection 및 세포 클로닝은 위에서와 동일하게 수행했으며, transfection에는 각 2  $\mu$ g의 DNA를 사용하였다. pTRE2hyg는 hygromycin 내성유전자를 갖고 있어 hygromycin (300  $\mu$ g/ml, Clontech)이 포함된 MEM으로 배양하였으며 3 주 이상 selection을 수행하였다.

#### Induction

각 transfectant 클론에서의 단백질 발현을 위해서 tetracycline analog인 doxycycline (Clontech)을 사용하였다(9). 적당량의 세포를 seeding하고 24 시간 동안 배양한 후(5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 실험 목적에 따라 0~20  $\mu$ g/ml의 doxycycline을 첨가하여 48~72 시간 동안 추가 배양하였다.

#### MTT assay

96-well 플레이트에 각 transfectant 클론  $2 \times 10^3$  개씩 맞춰 seeding하고 2 시간 후에 MTT (5 mg/ml, Sigma)를 배양액에 첨가하였다. 다시 4 시간을 배양한 후 solubilization solution (0.01 M HCl, 10% SDS)을 배양액과 1:1 (v/v)로 첨가하고 16 시간 후 ELISA reader를 이용하여 각 well의 흡광도를 확인하였다.

#### Chromatin condensation 분석

각  $2 \times 10^3$ 의 inducible expression transfectant 세포를 cover glass가 깔려 있는 60 mm 배양용기에 seeding하고 24 시간 동안 배양한 후, doxycycline 0~20  $\mu$ g/ml을 첨가하였다. 세포가 60~70% 정도의 단일층을 이루면, 차가운 PBS로 씻고 4% para-

formaldehyde로 15 분간 고정시켰으며, paraformaldehyde 제거 후, 0.1% NP40으로 10 분 동안 permeabilization시키고 0.5  $\mu$ l의 DAPI (1  $\mu$ g/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 용액을 첨가하여 잘 섞고 어두운 곳에서 5 분간 염색하였다. 최종적으로 염색된 세포는 차가운 PBS로 2~3 회 닦아준 후 mounting solution으로 세포를 덮고, 형광현미경(filter combination: 340/380 nm excitation filter, LP 340 nm barrier filter, Zeiss, Thornwood, USA)을 통하여 관찰하였다.

#### DNA fragmentation 분석

Low-molecular-weight의 DNA를 분리하기 위해 각 inducible transfectant를 60 mm 배양용기에 약  $2 \times 10^3$  개의 세포를 seeding 하였다. 24 시간 배양 후, 실험목적에 따라 doxycycline 0~20  $\mu$ g/ml을 첨가하고 다시 48~72 시간 동안 배양하였다. 차가운 PBS로 씻은 후 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 7.45)와 proteinase K (10  $\mu$ g/ml)로 세포를 용해시키고 원심분리(15,000 $\times$ g, 30 분)와 phenol/chloroform을 통하여 용출을 2 회 수행하였다. RNA는 RNase A (10 mg/ml, 37°C, 30 분)로 제거하고 최종 DNA는 1.8% agarose gel (TBE)에서 전기영동으로 분석하였다.

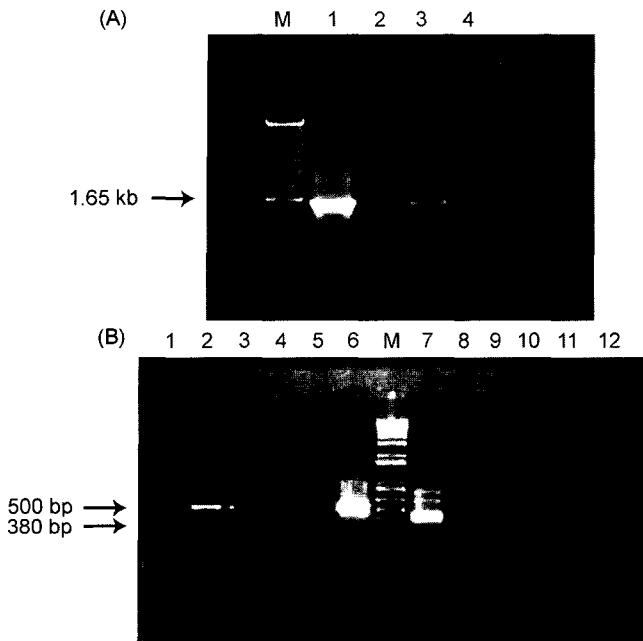
#### Flow cytometric analysis

각 inducible expression transfectant를 100 mm 배양용기에 적당량 seeding하고 24 시간 배양 후, doxycycline 0~20  $\mu$ g/ml을 배양액에 첨가하였다. 각 세포가 약 70%~80% 정도 자랐을 때 PBS로 세척하고 1 ml 1 $\times$ trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 처리한 후, 9 ml의 MEM으로 부유하였다. PBS로 2 회 더 세척한 다음, 1 ml의 PBS에 부유하여 최종농도 70%의 ethanol로 고정시켰다 (4°C 30 분~2 시간, 또는 -20°C 2 시간 이상). 고정된 세포는 PBS 세척 후, 1°C의 propidium iodide (PI) 용액(10  $\mu$ g/ml PI, 250  $\mu$ g/ml RNase A: Sigma)을 첨가하여 상온에서 30 분간 염색하였다. 세포의 DNA contents는 FACScan (Becton Dickinson Instruments)으로 분석하였으며, CellQuest (version 1.2, Becton Dickinson)에 의해 20,000 개의 세포가 계수되었다.

## 결 과

#### 일본 뇌염 바이러스 구조 단백질 유전자의 cloning

JEV K94P05의 capsid (96~476: 380 bp), prM (477~977: 500 bp) 및 envelope (978~1499: 527 bp)단백질의 완전한 ORF를 CMV minimal promoter, ampicillin 및 hygromycin 내성유전자를 가진 tetracycline response vector인 pTRE2hyg vector (Clontech)에 클로닝하였다(Fig. 1). 재조합 plasmid의 구조단백질 유전자들은 cDNA 합성에 사용한 primer에 존재하는 BamHI과 SalI으로 절단, 전기영동으로 삽입된 각 유전자의 크기를 확인하고, 접합 부분의 염기서열을 분석하여 response vector가 정확히 연결되었음을 확인하였다(자료생략).

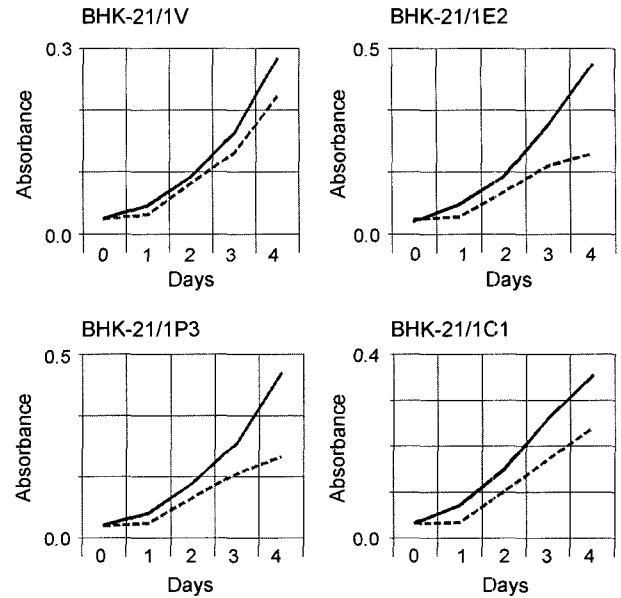


**Fig. 2.** Detection of JEV structural protein mRNA from BHK-21 transfectants by RT-PCR. (A) mRNA for E protein (1499 bp). Lanes M, 1 kb plus ladder; 1, JEV infected BHK-21; 2, BHK-21/IE2(-); 3, BHK-21/IE2(+); 4, BHK-21/IV(+). (B) mRNAs for prM/M (500 bp) or C (380 bp). Lanes M, 1 kb plus ladder; 1, BHK-21/IV(+); 2, BHK-21/IP1(+); 3, BHK-21/IP1(-); 4, BHK-21/IP3(+); 5, BHK-21/IP3(-); 6, JEV-infected BHK-21; 7, JEV infected BHK-21; 8, BHK-21/IC1(-); 9, BHK-21/IC1(+); 10, BHK-21/IC3(-); 11, BHK-21/IC3(+); 12, BHK-21/IV(+). (-) without induction; (+) with induction

**Inducible Expression Cell Lines의 구축**

각 inducible transfectant가 도입된 유전자들을 잘 발현하는지를 확인하기 위하여 RT-PCR를 이용하여 발현된 mRNA를 검출하였다(Fig. 2, A and B). Transfectant 세포를 60 mm 배양용기에 seeding하고 24 시간 배양 후, doxycycline으로 induction하여 다시 48~72 시간 동안 배양하여 세포내 RNA를 분리하였다. RT-PCR에서는 도입된 DNA 유전자에 의한 위양성(false positive)을 배제하고 발현된 mRNA만을 검출할 수 있도록 역전사과정에는 poly (A) tail에 특이적인 oligo dT를 사용하였으며, PCR에는 클로닝에 사용했던 primer sets를 사용하였다.

JEV ‘E’ 유전자를 갖고 있는 BHK-21/IE2 transfectant의 경우 wild-type 바이러스가 감염된 지 36 시간 된 세포에서의 발현 정도와 비교하여 induction 후 충분한 전사와 해독 모두 잘 이뤄짐을 간접적으로 보여주었다. 반면에 induction 시키지 않았을 경우엔 해당 mRNA의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 2). JEV ‘prM/M’을 보유한 BHK-21/IP1과 BHK-21/IP3, JEV ‘C’ 유전자를 보유한 BHK-21/IC1과 BHK-21/IC3 네개의 클론 모두에서 induction에 따라 활발한 전사가 확인되었지만 induction 이전의 mRNA 발현이 가장 적다고 판단된 BHK-21/IP3와 BHK-21/IC1을 선택하여 이후의 실험에 사용하였다(Fig. 2).



**Fig. 3.** Cell growth curve of BHK-21/IV, BHK-21/IE2, BHK-21/IP3 and BHK-21/IC1. The number of viable cells are counted by MTT assay as described in Materials and Methods. Solid line, without induction; Dashed line, with induction

**JEV 구조단백질 transfectants의 성장곡선**

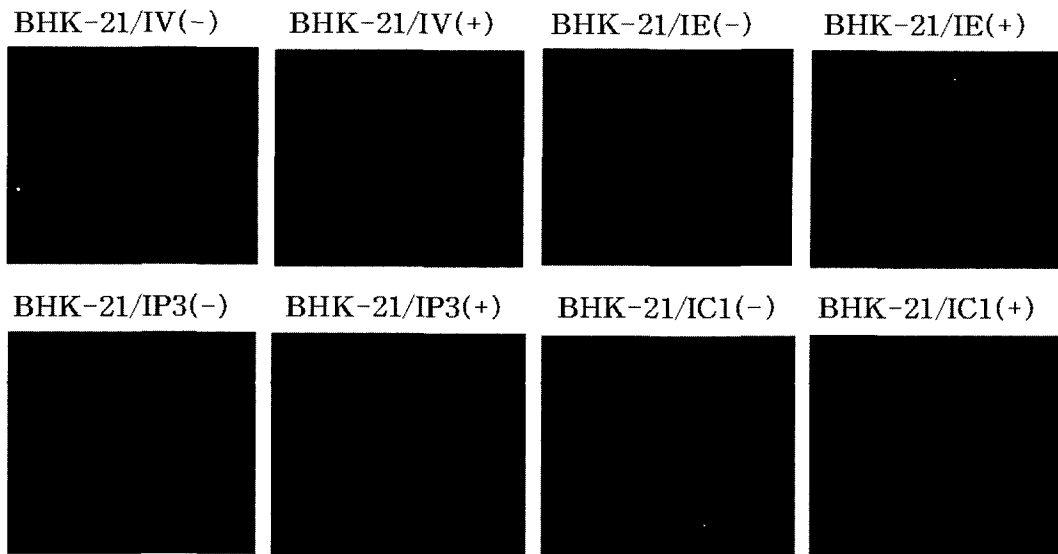
Transfectants 모두 induction 후, induction 이전에 비해 전반적인 세포성장이 느려진 것이 관찰되어 MTT assay로 각 transfectant의 성장곡선을 비교하였다(Fig. 3). JEV의 구조단백질 유전자가 없는 vector plasmid (pTRE/hyg)와 regulation vector plasmid (pTet-on)가 도입된 대조구 transfectant BHK-21/IV의 경우에도 induction 후 매우 작으나마 세포성장의 둔화가 보이는데, 이것은 유도물질 doxycycline 자체에 의한 영향으로 판단된다. 반면에 구조단백질 발현 vector가 도입된 transfectants의 경우, 세 가지 단백질 모두에서 세포성장이 현저하게 저하되는 것이 확인되었다.

**JEV 구조단백질 transfectants의 chromatin condensation**

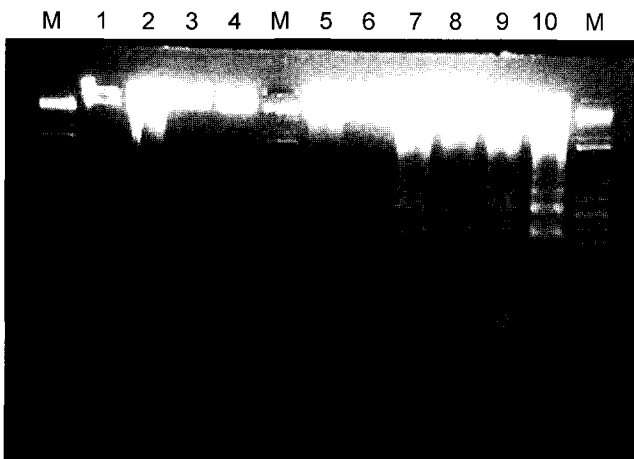
JEV의 구조단백질 발현과 JEV 감염에 의한 apoptotic CPE와의 관계를 알아보기 위한 한 방법으로 JEV 구조단백질 transfectants의 핵을 DAPI로 염색하여 chromatin configuration의 변화여부를 알아보았다. Naive BHK-21 세포의 핵 내에서는 아무런 변화가 없었으나, JEV 감염세포는 감염 후 40 시간째 약하지만 전반적으로 chromatin condensation 현상이 관찰되었다(자료생략). 한편, BHK-21/IV에서는 induction 전과 후에 특별한 변화가 관찰되지 않았으나, 구조단백질 유전자가 도입된 BHK-21/IE, BHK-21/IP, BHK-21/IC에서는 induction 후, 모두 JEV 감염세포에서 관찰된 정도 이상의 현격한 chromatin condensation이 관찰되었다(Fig. 4).

**DNA fragmentation의 분석**

DAPI 염색에 의한 chromatin condensation의 확인은 JEV에 의



**Fig. 4.** Detection of chromatin condensation by DNA fluorochrome (DAPI) staining. Vector control BHK-21/IV cells (upper panels) and BHK-21/IE2 cells (lower panels) were stained with DAPI as described in Materials and Methods. (-), without induction; (+), with induction.



**Fig. 5.** DNA fragmentation revealed by low-molecular weight DNA gel electrophoresis of JEV structural protein expressing BHK-21 cells. Lanes M, 1 kb plus ladder; 1, naive BHK-21; 2, JEV infected BHK-21; 3, BHK-21/IV(-); 4, BHK-21/IV(+); 5, BHK-21/IE(-); 6, BHK-21/IE(+); 7, BHK-21/IP(-); 8, BHK-21/IP(+); 9, BHK-21/IC(-); 10, BHK-21/IC(+). (-), without induction; (+), with induction.

한 apoptosis에 바이러스 구조단백질이 연관되어 있을 가능성이 제시되었으며 이에 또 다른 apoptosis 지표로 사용되는 internucleosomal DNA의 fragmentation의 여부를 조사하였다(Fig. 5). JEV 감염세포에서는, 감염 후 40 시간에도 이미 뚜렷한 DNA fragmentation이 관찰되었으나 BHK-21/IV에서는 induction 전후 모두 naive BHK-21과 같이 DNA fragmentation은 보이지 않았다. 한편, BHK-21/IE의 경우도 induction 전후 모두에서 뚜렷한 DNA fragmentation이 관찰되지 않았으나, BHK-21/IP에서는 induction과 무관하게 DNA의 fragmentation이 나타났다. Capsid mRNA가 발현되는 BHK-21/IC의 경우 induction 전에도 BHK-

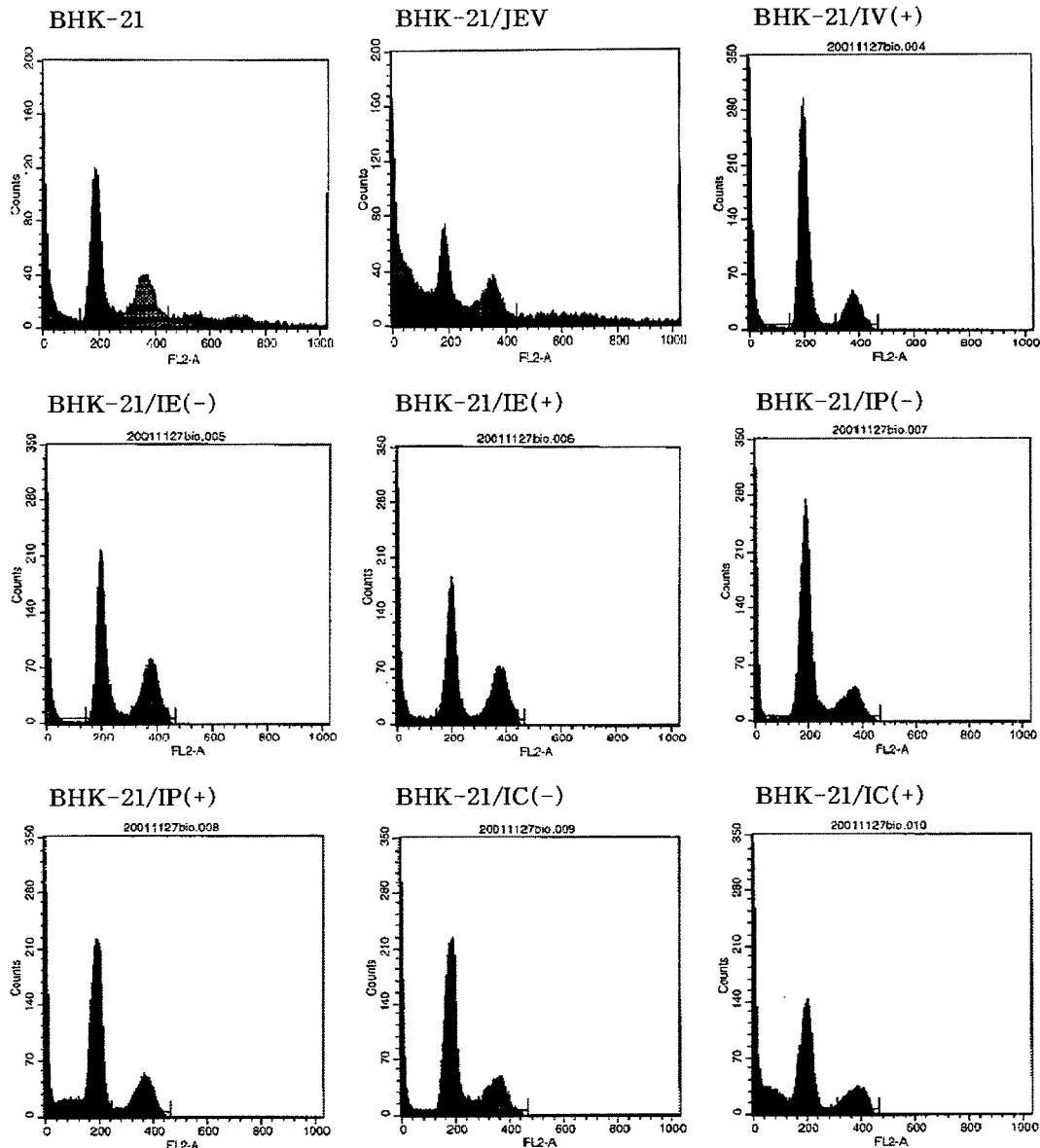
21/IP와 유사한 정도의 DNA fragmentation이 나타났지만 induction 후에는 그 정도가 현저히 증가하였다.

**JEV 구조단백질 transfectants의 flow cytometry**

지금까지의 결과를 바탕으로 JEV 구조단백질 중, 특히 ‘prM/M’과 ‘C’ 등이 발현되는 transfectant들에서 나타나는 변화가 apoptosis의 특성이 확인하기 위해 doxycyclin induction 후 PI로 염색하고 flow cytometry로 조사하였다(Fig. 6). JEV 감염세포들은 감염 후 32 시간에서 sub-G0/G1 집단의 비율이 현격하게 증가하면서 전체적인 변화를 주도하는 것으로 나타났다. 대조군 transfectant BHK-21/IV의 경우 다른 실험에서와 동일하게 induction 전후 아무런 변화가 없었고, BHK-21/IE에서는 induction 후 sub-G0/G1 비율이 소폭 증가하여 약 5% 정도, BHK-21/IP에서는 약 6% 정도를 차지하였다. 이와 달리 BHK-21/IC의 경우에는 induction 후 sub-G0/G1 비율이 전체의 약 25% 정도로 나타나 현저한 증가를 나타냈다(Fig. 8). 이 결과는 chromatin condensation 및 DNA fragmentation 결과 모두에 상응하는 것으로써 JEV의 capsid 단백질과 바이러스에 감염된 숙주세포의 apoptosis 유도기전의 연관성을 비중 있게 제시하였다.

**고 찰**

본 연구에서는 JEV 구조단백질(E, prM/M, C) 세 종류를 tetracycline inducible expression system을 이용, JEV 감염에서 전형적인 lytic infection을 나타내는 BHK-21 세포에 도입시켜 각 구조단백질의 독립발현이 세포에 어떤 변화를 일으키는 지 관찰하였다. Transfectant chromosome DNA 상에 삽입된 각 구조 유전자들의 확인(자료생략) 및 doxycyclin induction 후 각 transfectant에서의 활발한 구조단백질 mRNA 전사는 이 system에 의한 바이러스 단백질의 발현을 간접 시사하였다. 물론, 각



**Fig. 6.** DNA content profiles of BHK-21 cells expressing JEV structural proteins illustrated by flow cytometry after PI staining as described in materials and methods. BHK-21/JEV, JEV-infected naive BHK-21 cells; (-), without induction; (+), with induction.

구조단백질에 대한 특이항체를 이용하여 최종발현산물을 확인하는 과정이 부차적으로 필요하겠으나 현실적으로 각 JEV 구조단백질에 대한 특이항체는 아직 보편화되어 있지 못하며 이 문제는 서둘러 해결해야 할 JEV 단백질 발현연구의 과제이다. 한편, 몇몇 transfectants에서는 induction 전에도 소량의 mRNA 발현이 관찰된 바 있었으며 이는 tetracycline inducible expression system에서 종종 induction 없이 매우 낮은 수준의 단백질이 발현되었다는 이전의 보고(11,22)와 일치한다.

JEV의 세 가지 구조단백질은 세포성장을 눈에 띄게 지연시켰다. Transfectant 대조군 BHK-21/IV의 경우, 본래 세포의 개체수 증가에 영향을 미치는 doxycyclin의 화학적 특성에 기인한 효과로 판단되어지나, BHK-21/IE, BHK-21/IP, BHK-21/IC의 경우는

BHK-21/IV와 비교해도, 현저한 세포성장의 둔화를 나타낸 결과는 각 구조단백질 발현에 의한 직접적인 영향으로 판단된다. Measles virus, Reovirus 그리고 HIV type 1 등의 경우 숙주 세포에 감염 시에 cell cycle을 arrest시키는 현상을 일으킨다고 보고되어져 있다(6,21,25). 이 경우 바이러스가 세포 내로 들어가 복제를 하는 동안 생성되는 각각의 단백질이 바이러스의 생산을 극대화시키기 위해 숙주 세포의 세포 성장관련 단백질을 공격함으로써 일어나는 현상으로 이해되어지고 있다. 본 실험에 나타난 세포 성장의 지연 역시 이 경우와 비슷한 경우로 JEV 구조단백질 각각이 세포 성장에 현격하게 영향을 미치는 것으로 보아 더 나아가 전반적인 세포 주기에도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

각 transfectant의 chromatin condensation (Fig. 4) 분석에서

doxycyclin induction 전에도 BHK-21/IP 및 BHK-21/IE'에서는 약하나마 양성반응을 보이는 것은 낮은 수준의 단백질 발현에 기인한 것으로 추정된다. 한편 BHK-21/IC의 DNA fragmentation 분석결과는 chromatin condensation 결과와 매우 상응하였으며 induction 전 다소의 DNA fragmentation은 역시 위에 언급한 것처럼 낮은 수준의 단백질 발현에 의한 영향으로 추정된다. BHK-21/IE의 경우 BHK-21/IP에서와는 반대로 induction과 무관하게 DNA fragmentation을 나타내지 않아, 'E' 단백질의 발현이 chromatin condensation에 어느 만큼 영향을 끼쳤으나 DNA fragmentation에는 그렇지 못하는 것으로 판단된다.

위의 두 결과들은 flow cytometry에서 다시 확인되고 있다. BHK-21/IE과 BHK-21/IP의 경우 각각의 sub-G0/G1 비율은 전체 세포 중 약 5.5%, 약 4% 정도로서 대조구에 비해 현격한 증가를 나타내지는 않았다. 반면에 BHK-21/IC의 경우 sub-G0/G1의 비는 전체세포의 약 25%에 해당하여 현격한 apoptotic population의 증가를 제시하였고 이는 wild-type JEV에 의한 sub-G0/G1의 비율 증가와 대등한 수준이었다(Fig. 6).

이상의 실험결과를 바탕으로, JEV capsid 단백질은 숙주세포에서 apoptosis를 유도하는 독립적인 요인들 중 하나일 것으로 판단되며 envelop 및 prM/M 단백질은 chromatin condensation이나 세포성장 등에는 영향을 미치지만 모든 실험에서 일관성 있는 apoptosis의 특성을 보여주지 못해 이 단백질들이 숙주세포의 apoptosis 유도에 독립적이며 직접적으로 관여할 가능성은 높지 않을 것으로 믿어진다. JEV 구조단백질에 대한 세포생물학적 관련연구는 지극히 제한적으로 시도되어왔으며 이번 연구에서의 inducible expression system 구축은 향후 JEV 구조단백질에 대한 체계적인 분석연구의 유용한 기틀이 될 수 있을 것이다. 더욱이 HCV의 core와 동일한 진화적 기원에서 출발했을 JEV의 capsid에 대한 보다 깊은 이해는 숙주세포의 성장과 유지에 대한 RNA 바이러스들의 제어기전을 밝히는데 크게 기여하게 될 것이다(3).

## 감사의 글

본 연구를 위해 일본뇌염바이러스 국내분리주 K94P05를 제공한 국립보건원 신경계바이러스과에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Brinton, M.A. 1986. Replication of flaviviruses. pp. 327-365. In S. Schlesinger (ed). *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum, New York.
- Calisher, C.H., N. Karabatsos, J.M. Dalrymple, R.E. Shope, J.S. Porterfield, E.G. Westway, and W.E. Brandt. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests. *J. Gen. Virol.* 70, 37-43.
- Chambers, T.J. and C.S. Hahn. 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 649-688.
- Chambers, T.J. and A. Nestorowicz. 1993. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation and viral replication. *J. Virol.* 67, 6797-6807.
- Desaintes, C., C. Demeret, S. Goyat, M. Yaniv, and F. Thierry. 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 16, 504-514
- Engelking, O., L.M. Fedorov, R. Lilischkis, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 1999. Measles virus-induced immunosuppression *in vitro* is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1599-1608
- Falgout, B., M. Pethel, Y.M. Zhang, and C.J. Lai. 1991. Both non-structural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 65, 2467-2475.
- Ghosh, A.K., R. Steele, K. Meyer, R. Ray, and R.B. Ray. 1999. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J. Gen. Virol.* 80, 1179-1183.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- Hagemeier, C., R. Caswell, G. Hayhurst, J. Sinclair, and T. Kouzarides. 1994. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 13, 2897-2903.
- Kim, H.T., H.S. Lee, and Y.D. Yun. 1998. X-gene product of hepatitis virus induces apoptosis in liver cells. *J. Biol. Chem.* 273, 381-385.
- Kuo, M.D., C. Chin, S.L. Hsu, J.Y. Shiao, T.M. Wang, and J.H. Lin. 1996. Characterization of the NTPase activity of *Japanese encephalitis virus* NS3 protein. *J. Gen. Virol.* 77, 2077-2084.
- Levine, B, Q. Huang, J.T. Isaacs, J.C. Reed, D. Griffin, and J.M. Hardwick. 1993. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the *bcl-2* cellular oncogene. *Nature* 361, 739-742.
- Liao, C.L., Y.L. Lin, S.C. Shen, J.Y. Shen, H.L. Su, Y.L. Huang, S.H. Ma, Y.C. Sun, K.P. Chan, and L.K. Chen. 1998. Antiapoptotic but not antiviral function of human *bcl-2* assists establishment of *Japanese encephalitis virus* persistence in cultured cells. *J. Virol.* 72, 9844-9855.
- Marusawa, H., M. Hijikata, T. Chiba, and K. Shimotohno. 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas-and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappa B activation. *J. Virol.* 73, 4713-4720.
- Mathur, A., M. Bharadwaj, R. Kulshreshtha, S. Rawat, A. Jain, and U.C. Chaturvedi. 1988. Immunopathological study of spleen during *Japanese encephalitis virus* infection in mice. *Br. J. Exp. Pathol.* 69, 423-432.
- Ray, R.B., L.M. Lagging, K. Meyer, and R. Ray. 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryonic fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* 70, 4438-4443.
- Rice, C.M. 1996. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. pp.931-652. In D.M. Knipe *et al.*, (eds). *Fields Virology*. Raven Press. Philadelphia. PA.
- Ruggieri, A., T. Harada, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1997. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 229, 68-76.
- Sakamuro, D., T. Furukawa, and T. Takegami. 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 69, 3893-3896.
- Saragovi, U.H., N. Rebai, G.M. Di Guglielmo, R. Macleod, J. Sheng, D.H. Rubin, and M.I. Greene. 1999. A G1 cell cycle arrest

- induced by ligands of the Reovirus type 3 receptor is secondary to inactivation of p21 and mitogen-activated protein kinase. *DNA Cell Biol.* 18, 763-770.
22. Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, G. Neumann, Y. Kawaoka, and V.S. Hinshaw. 2001. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J. Virol.* 75, 7875-7881.
  23. Sommer, R.J. and P.W. Sternberg. 1996. Apoptosis and change of competence limit the size of the vulva equivalence group in *Pristionchus pacificus*: a genetic analysis. *Curr. Biol.* 6, 52-59.
  24. Speir, E., R. Modali, E.S. Huang, M.B. Leon, F. Shawl, T. Finkel, and S.E. Epstein. 1994. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.
  25. Stewart, S.A., B. Poon, J.B. Jowett, and I.S. Chen. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J. Virol.* 71, 5579-5592.
  26. Tollefson, A.E., A. Scaria, T.W. Hermiston, J.S. Ryerse, L.J. Wold, and W.S. Wold. 1996. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* 70, 2296-2306.
  27. Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M.M. Lai. 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J. Virol.* 72, 3691-3697.

(Received August 13, 2002/Accepted September 9, 2002)

---

**ABSTRACT: Cytopathic Effects of Japanese Encephalitis Virus Structural Proteins in BHK-21 Cells**  
**Ki-Min Seong and Yong Seok Jeong** (Department of Biology and Research Institute of Basic Sciences, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea)

Inducible expression system for the three structural proteins, capsid (C), precursor membrane (prM/M), and envelop (E) of *Japanese encephalitis virus* (JEV) was established in BHK-21 cells. Doxycycline, a tetracycline analog, was utilized as an inducer. Transfectants BHK-21/IV (vector only), BHK-21/IC (for C), BHK-21/IP3 (for prM), and BHK-21/IE1 (for E) were selected and cloned in the presence of G418 or hygromycin. Transcribed mRNAs for the corresponding genes were observed after doxycycline induction. Effects by the JEV structural gene expression on the transfectants were monitored via cell growth, chromatin condensation, internucleosomal DNA fragmentation, and DNA contents analyses. Clear cell growth retardation and chromatin condensation were observed in all three transfectants while only BHK-21/IC corresponded to the induction status in the DNA fragmentation and DNA content analyses. Combined results, therefore, suggested that JEV capsid protein should be one of the direct and independent factors in apoptotic cell death induced by JEV infection.