

새로운 스트레스 단백질인 VISP의 세포내 위치

문창훈 · 윤원준 · 고명석 · 김현주¹ · 박정우

울산대학교 생명과학부, ¹포항공과대학 생명과학과

이전의 연구 결과 어류 rhabdovirus에 감염된 세포에서 virus-inducible stress protein (VISP)의 발현이 증가함을 확인하였다. 본 연구에서는 VISP의 세포내 위치를 확인하였으며, 또한 세포내 위치 결정에 중요한 역할을 담당하는 VISP의 부위를 확인하였다. 먼저 endogenous VISP의 세포내 위치를 확인하기 위하여 CHSE-214 세포를 VISP에 대한 단클론항체를 사용하여 염색한 후 confocal microscope로 관찰하였다. 그 결과 VISP가 세포의 핵 주변에 점구조를 형성함이 확인되었다. 이를 확인하기 위하여 VISP에 enhanced green fluorescent protein (EGFP)이 붙은 fusion gene을 발현하는 plasmid를 제조하였다. EGFP-VISP를 발현하는 plasmid 벡터를 세포에 transfection 시킨 후 confocal microscope로 관찰한 결과 핵 주변에 점구조를 형성함이 확인되었다. VISP의 아미노산 서열 중 핵 주변의 점구조 형성에 관여하는 부분을 확인하기 위하여 VISP의 다양한 deletion mutant들을 제조하였다. 이 mutant를 사용한 transfection 실험 결과 VISP의 C-terminal 부위(aa 612-710)가 핵 주변의 점구조 형성에 중요한 역할을 담당함이 확인되었으며, 이 부분의 functional motif 분석결과 691-TLTSLLL-697 부위에 nuclear receptor binding motif가 존재함이 확인되었다. 이와 같은 결과들을 종합하면, VISP는 핵 주변에 존재하며 VISP의 C-terminal 부위가 핵 주변 분포에 중요한 역할을 담당함을 알 수 있었다. 이후의 연구로부터 VISP의 핵 주변 분포가 IHNV의 성장에 미치는 영향이 확인되면 IHNV 병원성의 새로운 기작을 밝혀내는 중요한 자료가 될 것이다.

Key words □ EGFP fusion protein, subcellular localization, VISP

세포가 stress성 자극을 받게 되면 chaperone 활성을 지니는 stress protein의 발현이 증가하게 되는데, 발현이 증가한 stress protein은 stress에 의한 세포의 damage를 완화시키는 역할을 하게 된다. Stress protein은 분자량에 따라 hsp60 (약 60 kDa), hsp70 (약 70 kDa) 그리고 hsp90 (약 90 kDa)의 세 개의 family로 구분하고 있다 (23).

Stress protein은 heat shock, 영양분 결핍, oxygen radical, 대사 저해 물질, 중금속 등과 같은 stress 이외에 바이러스의 감염시에도 발현이 증가되는 것으로 보고된다. 예로써, paramyxovirus (8), adenovirus (27), herpesviruses (20, 25), papovavirus (17), rhabdovirus (10, 31), vaccinia virus (33), 등의 바이러스 감염시 세포의 hsp70 및 hsp90의 발현이 증가된다. 발현이 증가한 stress protein들은 viral polypeptides들과 결합함이 관찰 되었는데, 세포에 감염한 adenovirus (24), vaccinia virus (16), vesicular stomatitis virus (12, 13), 그리고 sindbis virus (26) 등의 polypeptides에 stress protein이 결합하고 있음이 확인 되었다. 이와 같이 viral polypeptide에 결합한 stress protein들은 viral polypeptide의 folding 및 assembly에 관여하여 바이러스의 증식을 도와주는 것으로 알려져 있다. 예로써 Hsp40은 HIV의 Nef 단백질에 결합하여 HIV의 증식을 도와주는 것으로 보고되며

(18), Hsp70은 polyomavirus의 large T antigen과 결합하여 Rb로부터 E2F의 분리를 촉진시키고(9) 세포에 감염한 polyomavirus와 결합하여 virus particle의 disassembly를 도와주며(7), virus의 replicase와 결합하여 바이러스 유전자의 복제를 촉진시키는 것으로 확인되었다(34).

Stress protein들은 세포내의 특정 위치에 존재하며 chaperone 역할을 수행한다. Heat shock cognate protein 70 (Hsc70)의 경우 Hsc70 안에 nuclear export signal (NES) 및 nuclear localization signal (NLS)를 동시에 지니고 있으며(36), 이를 이용하여 세포질과 핵 사이를 이동하면서 chaperone 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(11, 22). Hsp90은 주로 세포질에 존재하는 것으로 알려져 있는데(37), Hsp90의 C-terminal 부위가 세포질 분포에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(29).

본 연구진의 이전 연구 결과 rhabdovirus의 일종인 infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)에 감염된 어류세포에서 90 kDa 세포 단백질의 발현이 증가함이 확인되었다(21). 이 단백질은 바이러스 감염 이외에 heat shock에 의하여 발현이 증가하며, 또한 어류 세포이외에 mouse, rat, 사람 등의 세포에도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 90 kDa 단백질이 stress protein의 특성을 지님을 말해준다(5). 이와 같은 특성을 바탕으로 이 단백질의 이름을 virus-inducible stress protein (VISP)라고 명명을 하였다. VISP는 기존에 존재하는 stress protein들(hsp60, hsp70, hsp90, grp98, 그리고 grp94)과 분자량 및 항원성에 있어

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 052-259-2356, Fax: 052-259-1694
E-mail: jwpark@ulsan.ac.kr

서 다른 특성을 지님이 확인되었다(5). 또한 이 단백질의 cDNA를 cloning하여 염기 서열 및 아미노산 서열을 GenBank에 존재하는 다른 유전자들과 비교 분석한 결과 기존에 보고된 mammalian gene들과는 전혀 유사성이 없었고 prokaryote 유전자 중 peptide-binding protein과 부분적인 유사성을 지님을 확인하였다(6). 그리고 VISP는 denaturation된 단백질을 renaturation시키는 chaperone activity를 지니고 있음이 확인되었다(6). Chaperone activity를 지니는 VISP가 IHNV의 감염시 발현이 증가한다는 본 연구진의 연구 결과로부터 VISP가 IHNV의 증식에 중요한 역할을 할 가능성이 높음을 추측할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 chaperone activity를 지니는 VISP가 바이러스 감염시 어떤 역할을 수행할지에 대한 정보를 얻고자 VISP가 세포내의 어느 곳에 위치하는 지를 확인하기 위한 연구를 진행하였다. 그 결과 VISP가 핵막 주위에 점구조를 형성하며 존재함을 확인하였으며, 이와 같은 분포에 VISP의 C-terminal region이 중요한 역할을 담당함을 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 바이러스

IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryos) cell line을 사용하였다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium (MEM)을 사용하여 18°C에서 배양하였다. IHNV를 접종한 세포의 경우 16°C에서 배양하였다.

Plasmid construction

VISP의 full-length 및 truncated form들은 PCR을 사용하여 cloning하였다. PCR을 위한 template는 pET-VISP (6)를 사용하였으며, PCR primers는 VISP sequence (GenBank accession number AF527060)에 기초하여 제작하였다. PCR을 사용한 유전자 증폭 시 PCR primer의 5' end에 *XhoI* 제한효소의 sequence를 붙이고 3' end에 *BamHI* 제한효소의 sequence를 붙여 증폭시켰다. PCR 산물들은 pGEM-T vector (Promega)에 cloning한 후, 제한효소인 *XhoI*, *BamHI*를 이용하여 37°C에서 반응시켜 절단한 다음 pEGFP-N1 및 pEGFP-C1 (Clontech)에 subcloning하였다.

Transfection

Full-length VISP와 여러 truncated deletion mutant들을 발현시키기 위하여 CHSE-214 세포를 사용하였다. Transfection은 Lipofectamine-2000 (Invitrogen)을 사용하여 수행하였다. Transfection 24시간 전에 35 mm culture flask에 세포를 transfer하였다. Lipofectamine-2000 10 μ l와 DNA 4 μ l (2 μ g)를 각각 Opti-MEM 250 μ l에 넣어 희석시킨 후 상온에서 5분 두었다. 그 후, 희석된 Lipofectamine 2000과 DNA를 섞은 후 상온에서 30분 반응시킨 후 세포에 천천히 한 방울씩 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24~48시간 배양한 후 confocal microscope (FluoViewTM 500, Olympus)로 관찰하였다.

Immunohistochemical staining

VISP의 세포 내의 위치를 확인하기 위하여 VISP에 대한 단클론항체(21)를 사용한 immunohistochemical 염색을 수행하였다. 먼저 CHSE-214 세포를 PBS로 세척한 후 3% paraformaldehyde로 고정시켰으며, 여기에 permeabilization solution (0.1% triton X-100 in 0.1% sodium citrate)을 처리한 후 PBS로 세척하였다. 1% PBS-BSA를 처리한 다음 VISP에 대한 단클론항체를 처리하고 4°C에서 1시간 반응시켰다. PBS로 세척한 다음 FITC가 conjugation되어 있는 anti-mouse IgG (Sigma) 항체를 처리하였고 4°C에서 1시간 반응시킨 뒤 confocal microscope (FluoViewTM 500, Olympus)로 결과를 관찰하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 면역제어연구센터의 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc., USA)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Endogenous VISP의 세포내 위치

먼저 VISP의 세포내 정확한 위치를 확인하기 위하여 세포가 지니는 endogenous VISP의 세포내 위치를 확인하였다. 이를 위하여 본 연구진이 제작한 VISP에 대한 단클론항체(21)를 사용한 immunohistochemistry를 수행하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 VISP는 주로 핵 주위에 점 구조를 형성하며 존재함이 확인되었다.

VISP-EGFP fusion protein의 세포내 위치

Fig. 1에서 나타난 결과가 본 실험에 사용한 단클론항체와 비특이적으로 결합한 다른 단백질의 세포내 위치일 가능성도 있다. 따라서 VISP에 GFP 형광 단백질을 붙인 후 VISP-GFP fusion 단백질의 위치를 분석함으로써 확인하고자 하였다. 이를 위하여 VISP의 full length ORF에 해당하는 cDNA를 pEGFP-N1 및 pEGFP-C1 expression vector에 cloning하여 각각 VISP-EGFP 및 EGFP-VISP fusion protein이 발현될 수 있도록 하였다. 이와 같이 제조한 plasmid를 CHSE-214 세포에 transient transfection하

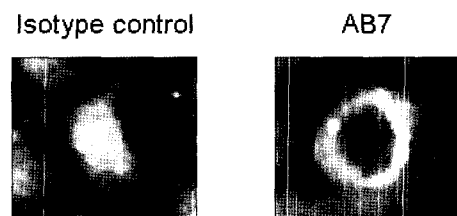


Fig. 1. Immunohistochemical staining for endogenous VISP. CHSE-214 cells were incubated with monoclonal antibody, AB7, raised against VISP and then with FITC conjugated rabbit anti-mouse IgG. The location of the green fluorescence was observed with confocal microscope.

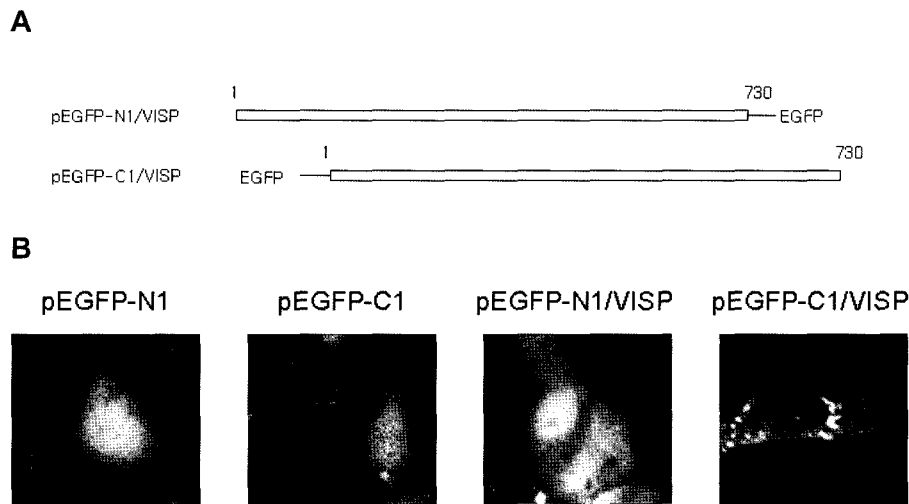


Fig. 2. Subcellular localization of full-length VISP fused with EGFP. (A) Full-length VISP was subcloned into pEGFP-N1 and pEGFP-C1 vectors. (B) CHSE-214 cells were transfected with pEGFP-N1, pEGFP-C1, pEGFP-N1/VISP, and pEGFP-C1/VISP and the location of the green fluorescence was observed with confocal microscope.

여 발현시킨 후 confocal microscope로 관찰하였다. 그 결과 VISP-EGFP는 pEGFP vector와 같이 세포 전체에 고르게 분포한 반면 EGFP-VISP는 핵막 주위에서 점구조를 형성하며 존재함이 확인되었다(Fig. 2). 이와 같이 두 종류 fusion protein의 세포내 위치가 다른 것은 EGFP가 VISP의 N-terminal에 결합한 경우 (EGFP-VISP)와 C-terminal에 결합한 경우(VISP-EGFP)의 3차구조가 달라서 나타난 현상일 가능성이 높다. 본 연구 결과에서는 EGFP가 VISP의 N-terminal에 붙은 EGFP-VISP의 경우, 단클론 항체를 사용한 endogenous VISP의 세포내 위치와 같이 핵막 주위의 점구조를 형성한 반면, EGFP가 VISP의 C-terminal에 붙은 VISP-EGFP의 경우 세포내 특정 위치에 분포하는 특성이 사라졌다. 이 결과로부터 VISP의 세포내 위치를 결정하는 부위가 VISP의 C-terminal에 존재할 가능성이 높으며 VISP-EGFP의 경우 EGFP가 VISP와 fusion protein을 형성하면서 VISP의 C-terminal 부분을 감싸서 핵막 주위로의 이동이 막아졌을 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. pEGFP-C1 vector에 subcloning하여 얻어지는 EGFP-VISP가 endogenous VISP와 세포내의 동일한 지역에 존재함이 확인되어 이후의 VISP의 세포내 분포확인 실험에 사용하였다.

VISP의 mutant form 제조

앞의 연구 결과 VISP가 핵막 주위에 점구조로 존재함이 확인되었는데, VISP의 어느 부분이 이와 같은 세포내 위치에 관여하는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 Fig. 3A와 같이 VISP의 다양한 deletion mutant form을 제조하였다.

VISP의 세포내 위치를 결정하는 region 확인

앞에서와 같이 제조한 VISP의 deletion mutant들을 CHSE-214 세포에 transfection 시킨 다음 세포내 위치를 확인하였다. 먼저 VISP를 C-terminal과 N-terminal 부분에 해당하는 deletion

mutant들인 VISP(1-350)과 VISP(351-730)을 대상으로 세포내 분포를 확인한 결과 VISP(1-350)은 control vector와 같이 세포 전체에 퍼져 존재함이 확인되었고, 반면에 VISP(351-730)은 핵주위에 존재함이 확인되었다(Fig. 3B). 이 결과로부터 VISP가 핵 주위에 존재하기 위해서는 C-terminal 부분이 중요함을 확인할 수 있었다. VISP의 C-terminal 중 어느 부분이 핵 주위의 분포에 관여하는지를 확인하기 위하여 C-terminal 부분의 다양한 mutant들을 세포에 transfection 시킨 다음 세포내 분포를 분석하였다. 그 결과 VISP의 730 amino acid sequence 중 C-terminal인 aa 612-710 부분이 핵막 주위의 점 구조물 형성에 중요함을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 앞의 실험 결과(Fig. 2)에서 VISP의 C-terminal에 EGFP가 결합한 VISP-EGFP fusion protein의 경우 핵막 주위의 점구조를 형성하지 않음이 확인되었는데, 이러한 현상이 나타난 이유는 EGFP가 VISP-EGFP fusion 단백질의 C-terminal에 존재하는 aa 612-710 부분을 막아서 나타난 현상일 가능성이 높다. 아직까지 VISP의 aa 612-710 부분이 어떤 역할을 수행하는지 모른다. 이 부위의 역할을 예측하기 위하여 eukaryotic protein들의 functional site를 분석해주는 ELM server (<http://www.elm.eu.org/>)(30)를 사용하여 VISP의 aa 612-710 부분에 존재하는 functional motif를 분석하였다. 그 결과 691-TLTSLLL-697 부분에 nuclear receptor와 결합에 관여하는 functional site가 존재함이 확인되었다. 아직 본 연구에서 VISP의 691-TLTSLLL-697 부분이 nuclear receptor와의 결합에 관여하는지, 그리고 nuclear receptor와의 결합이 핵주위의 점 구조 형성과 어떤 관계가 있는지 확인하지 못하였으며 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

Nuclear receptor는 ligand 결합에 의하여 활성이 조절되는 transcription factor들을 말한다. 지금까지 180종류 이상의 nuclear receptor들이 보고되었는데, 이들에 결합하는 ligand로는 steroid hormones, retinoids, thyroid hormones, vitamin D3, prosta-

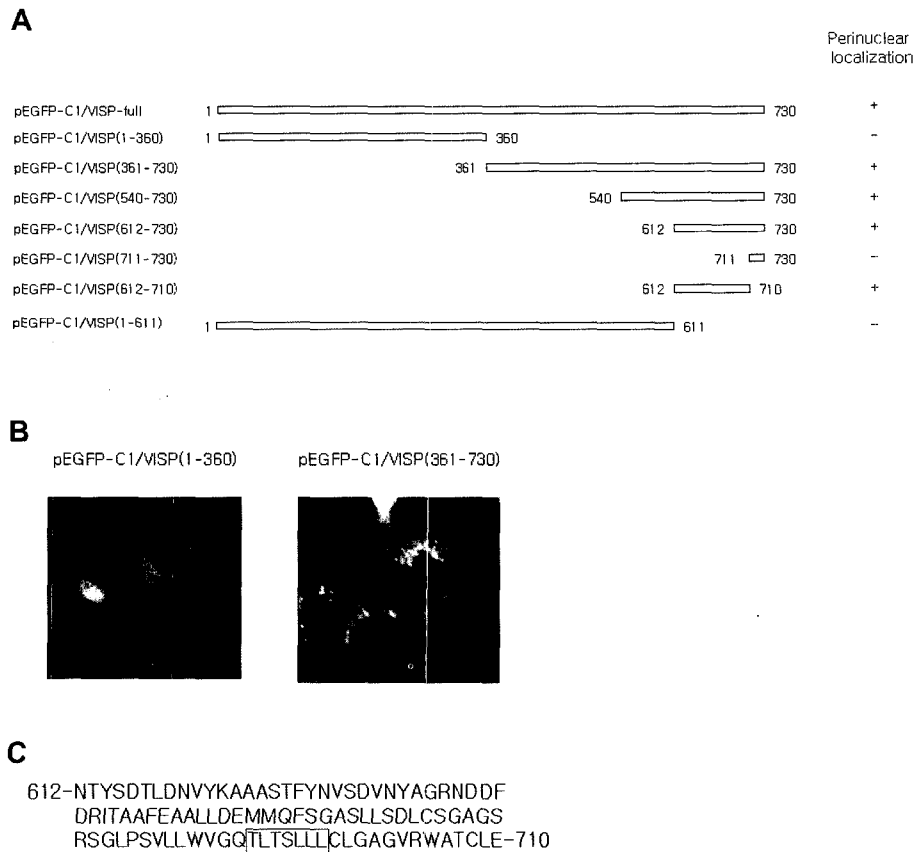


Fig. 3. Determination of the region of VISP responsible for the subcellular localization. (A) Various kinds of truncated forms of VISP were constructed and were transfected into CHSE-214 cells. The location of the green fluorescence in the cells was observed with confocal microscope. The numbers in the parentheses and above the bars represent VISP residues. Cells showing perinuclear localization of green fluorescence were categorized as positive. (B) Confocal microscopic observation of CHSE-214 cells transfected with pEGFP-C1/VISP(1-350) and pEGFP-C1/VISP(351-730). (C) Predicted functional motif within the C-terminal region of VISP. Amino acid sequences of the C-terminal region of VISP (aa 612-710) was analyzed for functional motif by using ELM server (<http://www.elm.eu.org/>). White box, possible candidate for the nuclear receptor binding motif.

glandins, fatty acids, 그리고 bile acids 등이 보고되어 있다(15). 많은 nuclear receptor들은 NES와 NLS를 동시에 지니고 있는데, ligand와 결합하지 않은 상태에서는 세포질에 존재하다가 ligand가 결합하면 핵으로 이동하여 다양한 target 유전자들의 발현을 유도한 결과 세포의 성장, 분화 및 apoptosis를 유발한다(19). 이러한 변화가 바이러스의 성장에 영향을 줄 수 있는데, 바이러스 성장을 촉진 시킬 수도 있고 반면에 억제할 수도 있는 것으로 보고된다. 먼저 nuclear receptor를 통한 신호가 바이러스의 성장을 촉진 시키는 경우는 다음과 같다. Hepatitis B virus (HBV)의 경우 nuclear receptor인 RXR α 와 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)의 활성화 결과 나타나는 변화를 바이러스의 성장에 이용한다(35). 그리고 HIV의 경우 바이러스의 Nef protein과 PPAR γ 와의 결합을 통하여 바이러스 성장을 촉진시킨다(28). 이와는 반대로 nuclear receptor를 통한 신호가 바이러스의 성장을 억제한다는 보고도 있다. Respiratory syncytial virus (RSV)에 감염된 세포에 PPAR γ agonists를 처리하면 바이러스의 유전자 발현이 억제 된다(2). 그리고 HBV의 경우 estrogen 처리

에 의하여 성장이 억제된다는 보고가 있다(1). 실제 HBV에 의하여 유도되는 간암의 경우 estrogen을 분비하는 여성의 간암 발생률이 남성보다 낮다는 보고들이 있다(4, 38). 이로부터 estrogen에 의한 estrogen receptor의 활성화 신호가 HBV의 성장을 막을 수 있는데, HBV는 HBx를 사용하여 estrogen receptor α (ER α)의 신호를 막음으로서 estrogen에 의한 바이러스 성장 억제 효과를 차단하는 것으로 보고된다(14).

일반적으로 nuclear receptor에는 ligand 뿐만 아니라 다른 단백질들도 결합하여 nuclear receptor의 활성을 조절하게 되는데, 그 중 하나로 stress protein의 일종인 Hsp90가 있다. 세포질에 존재하는 Hsp90은 ligand와 결합하지 않은 nuclear receptor와 결합하여 존재하고 있다가 ligand가 들어오게 되면 nuclear receptor와 ligand와의 결합을 유도함으로써 nuclear receptor의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다(3, 32). VISP는 염기서열 및 아미노산 서열이 Hsp90과 다르지만(6), 분자량이 약 90 kDa 정도이며(5) 다른 단백질의 folding을 도와주는 chaperone 활성을 지니고 있다는(6) 점에서는 Hsp90와 유사한 특성을 지니고 있다. 이로부터

VISP가 nuclear receptor와 결합한다면 그 역할은 Hsp90과 유사한 방법으로 nuclear receptor의 활성을 조절할 가능성이 높다.

만약 VISP가 nuclear receptor와 결합한다면 이러한 결합이 IHNV의 성장에 어떤 영향을 줄까? 앞에서 언급한 것과 같이 nuclear receptor를 통한 신호가 바이러스의 증식에 도움이 될 수도 있고 반면에 억제 효과를 보일 수도 있다. 본 연구진의 이전 보고에 따르면 IHNV에 감염된 세포에서 VISP의 발현이 증가하였으며 VISP의 발현이 증가함에도 IHNV의 성장이 정상적으로 이루어졌다(5, 21). 이로부터 VISP의 발현이 증가하여 nuclear receptor와 결합한다면 이는 IHNV의 증식을 도와주는 효과를 나타낼 가능성이 높다.

결론적으로 본 연구에서는 IHNV의 감염시 발현이 증가하는 stress protein인 VISP가 핵주위의 점구조를 형성하며 존재함을 확인 하였으며 이와 같은 세포내 점구조 형성에 VISP의 C-terminal 부위인 aa 612-710 부분이 중요함을 확인 하였다. 이 부분에 nuclear receptor와 결합하는 motif가 존재함을 확인하였는데, 이 부분이 실제 nuclear receptor와 결합하는 지, 결합한다면 어떤 종류의 nuclear receptor와 결합하는 지, 그리고 이와 같은 결합이 IHNV의 성장에 어떤 영향을 주는 지에 대한 추가 연구가 진행되면 IHNV의 세포내 성장 및 이 바이러스가 보이는 병원성 기작을 정확하게 이해할 수 있는 중요한 자료가 될 것으로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 2003년 울산대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Almog, Y., A. Klein, R. Adler, O. Laub, and R. Tur-Kaspa. 1992. Estrogen suppresses hepatitis B virus expression in male athymic mice transplanted with HBV transfected HepG-2 cells. *Antiviral Res.* 19, 285-293.
- Arnold, R. and W. Konig. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the replication of respiratory syncytial virus (RSV) in human lung epithelial cells. *Virology* 350, 335-346.
- Bresnick, E.H., F.C. Dalman, E.R. Sanchez, and W.B. Pratt. 1989. Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 4992-4997.
- Chen, C.J., M.W. Yu, and Y.F. Liaw. 1997. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, S294-308.
- Cho, W.J., S.J. Cha, J.W. Do, J.Y. Choi, J.Y. Lee, C.S. Jeong, K.J. Cho, W.S. Choi, H.S. Kang, H.D. Kim, and J.W. Park. 1997. A novel 90-kDa stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 233, 316-319.
- Cho, W.J., W.J. Yoon, C.H. Moon, S.J. Cha, H. Song, H.R. Cho, S.J. Jang, D.K. Chung, C.S. Jeong, and J.W. Park. 2002. Molecular cloning of a novel chaperone-like protein induced by rhabdovirus infection with sequence similarity to the bacterial extracellular solute-binding protein family 5. *J. Biol. Chem.* 277, 41489-41496.
- Chromy, L.R., A. Oltman, P.A. Estes, and R.L. Garcea. 2006. Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma- and papillomaviruses. *J. Virol.* 80, 5086-5091.
- Collins, P. L. and L. E. Hightower. 1982. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. *J. Virol.* 44, 703-707.
- Garimella, R., X. Liu, W. Qiao, X. Liang, E.R. Zuiderweg, M.I. Riley, and S.R. Van Doren. 2006. Hsc70 contacts helix III of the J domain from polyomavirus T antigens: addressing a dilemma in the chaperone hypothesis of how they release E2F from pRb. *Biochemistry* 45, 6917-6929.
- Garry, R.F., E.T. Ulug, and H.R. Bose, Jr. 1983. Induction of stress proteins in Sindbis virus- and vesicular stomatitis virus-infected cells. *Virology* 129, 319-332.
- Gething, M.J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Hammond, C. and A. Helenius. 1994. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266, 456-458.
- Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 913-917.
- Han, J., L. Ding, B. Yuan, X. Yang, X. Wang, J. Li, Q. Lu, C. Huang, and Q. Ye. 2006. Hepatitis B virus X protein and the estrogen receptor variant lacking exon 5 inhibit estrogen receptor signaling in hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 34, 3095-3106.
- Hart, S.M. 2002. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biol Res* 35, 295-303.
- Jindal, S. and R.A. Young. 1992. Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins. *J. Virol.* 66, 5357-5362.
- Khandjian, E.W. and H. Turler. 1983. Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1-8.
- Kumar, M. and D. Mitra. 2005. Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. *J. Biol. Chem.* 280, 40041-40050.
- Kumar, S., M. Saradhi, N.K. Chaturvedi, and R.K. Tyagi. 2006. Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 147-156.
- La Thangue, N.B., K. Shriver, C. Dawson, and W.L. Chan. 1984. Herpes simplex virus infection causes the accumulation of a heat-shock protein. *EMBO J.* 3, 267-277.
- Lee, J.Y., W.J. Cho, J.W. Do, H.J. Kim, J.W. Park, M.A. Park, S.G. Sohn, G. Jeong, and Y.C. Hah. 1996. Monoclonal antibodies raised against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize IHNV infection in vitro. *J. Gen. Virol.* 77, 1731-1737.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S. and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-637.
- Macejak, D.G. and R.B. Luftig. 1991. Association of HSP70 with the adenovirus type 5 fiber protein in infected HEP-2 cells. *Virology* 180, 120-125.
- Macnab, J.C., A. Orr, and N.B. La Thangue. 1985. Cellular pro-

- teins expressed in herpes simplex virus transformed cells also accumulate on herpes simplex virus infection. *EMBO J.* 4, 3223-3228.
26. Mulvey, M. and D.T. Brown. 1995. Involvement of the molecular chaperone BiP in maturation of Sindbis virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 69, 1621-1627.
 27. Nevins, J.R. 1982. Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 29, 913-919.
 28. Otake, K., S. Omoto, T. Yamamoto, H. Okuyama, H. Okada, N. Okada, M. Kawai, N.K. Saksena, and Y.R. Fujii. 2004. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated complexes. *AIDS* 23, 189-198.
 29. Passinen, S., J. Valkila, T. Manninen, H. Syvala, and T. Ylikomi. 2001. The C-terminal half of Hsp90 is responsible for its cytoplasmic localization. *Eur J Biochem.* 268, 5337-5342.
 30. Puntervoll, P., R. Linding, C. Gemund, S. Chabanis-Davidson, M. Mattingsdal, S. Cameron, D.M.A. Martin, G. Ausiello, B. Brannetti, A. Costantini, F. Ferrè, V. Maselli, A. Via, G. Cesareni, F. Diella, G. Superti-Furga, L. Wyrwicz, C. Ramu, C. McGuigan, R. Gudavalli, I. Letunic, P. Bork, L. Rychlewski, B. Kuster, M. Helmer-Citterich, W.N. Hunter, R. Aasland, and T.J. Gibson. 2003. ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31, 3625-3630.
 31. Sagara, J. and A. Kawai. 1992. Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion. *Virology* 190, 845-848.
 32. Scherrer, L.C., F.C. Dalman, E. Massa, S. Meshinchi, and W.B. Pratt. 1990. Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex. *J. Biol. Chem.* 265, 21397-21400.
 33. Sedger, L. and J. Ruby. 1994. Heat shock response to vaccinia virus infection. *J. Virol.* 68, 4685-4689.
 34. Serva, S. and P.D. Nagy. 2006. Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication. *J. Virol.* 80, 2162-2169.
 35. Tang, H. and A. McLachan. 2001. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1841-1846.
 36. Tsukahara, F. and Y. Maru. 2004. Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem.* 279, 8867-8872.
 37. Tuohimaa, P., A. Pekki, M. Blauer, T. Joensuu, P. Vilja, and T. Ylikomi. 1993. Nuclear progesterone receptor is mainly heat shock protein 90-free in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 5848-5852.
 38. Yu, M.W. and C.J. Chen. 1994. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 17, 71-91.

(Received September 27, 2006/Accepted December 20, 2006)

ABSTRACT: Subcellular Localization of Novel Stress Protein VISP

Chang Hoon Moon, Won Joon Yoon, Myoung Seok Ko, Hyun Ju Kim¹, and Jeong Woo Park (Department of Biological Sciences, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea and ¹Division of Molecular and Life Sciences, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Pohang 790-784, Korea)

Previously we demonstrated that virus-inducible stress protein (VISP) is induced in fish cells by the infection of a fish rhabdovirus. In this paper, we investigated the subcellular localization of the VISP and determined the region of VISP responsible for the subcellular localization. The CHSE-214 cells were stained with monoclonal antibody raised against VISP and observed with confocal microscope to detect the endogenous VISP. The results showed that the VISP localizes to the perinuclear region as spots. A plasmid expressing VISP fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP) was constructed. The transient expression of full-length VISP fused to EGFP in CHSE-214 cells confirmed the spot formation of the VISP at perinuclear region. To determine the region responsible for the perinuclear localization of the VISP, we constructed a series of deletion mutants and, by using these deletion mutants, we found that C-terminal region of the VISP (aa 612-710) is essential for the perinuclear distribution of VISP and that this region contained nuclear receptor binding motif (691-TLTSLLL-697). Our results suggest that VISP localizes to the perinuclear region and C-terminal regions are important for this localization. Further studies on the role of the perinuclear localization of VISP in IHNV growth may reveal the novel mechanism of IHNV pathogenesis.