

합포체 분석을 위해 R 펩타이드가 절여된 형광 표지 Moloney 마우스레트로바이러스 Molecular Clone 제조

이용진 · 박진우 · 이규준 · 배은혜 · 박성한 · 임지현 · 김새로미 · 정용태*

단국대학교 첨단과학대학 미생물학과

레트로바이러스는 바이러스 외막과 숙주세포막의 융합에 의해 세포내로 들어간다. Moloney 마우스레트로바이러스(murine leukemia virus)의 외막 단백질은 표면단백질(SU)과 막단백질(TM)을 포함하는 85 kDa의 전구체로 합성되는데 바이러스의 성숙과정에 막단백질의 카르복시 말단 16개의 아미노산(R-peptide)이 바이러스의 프로티아제에 의해 절단된다. R 펩타이드가 절단된 막단백질은 Moloney 마우스레트로바이러스에 대한 수용체를 가진 NIH3T3 세포주에서 합포체(syncytium)를 형성한다. R 펩타이드가 절단된 막단백질의 합포체 형성 기작 연구를 위해 R 펩타이드가 절단되어 있으며 표면단백질의 PRR (proline rich region) 부위가 EGFP로 삽입되어진 Moloney full length molecular clone을 만들었다. 이 clone은 NIH3T3 세포에서 합포체를 형성하였으며 형광이 세포질과 세포막에서 관찰되었으나 핵은 염색이 되지 않고 검게 보여 신속·정확하게 합포체 관찰이 가능하였다. 흥미롭게도 절단된 막단백질을 가진 비리온이 NIH3T3 세포에서 광학현미경으로 관찰하였을 때는 합포체를 형성하였으나 형광현미경에서는 형광이 관찰되지 않아서 비리온이 세포감염 없이 바이러스-세포 융합 방식으로 합포체를 형성한 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 형광의 발현 여부로 합포체 형성을 신속·정확하게 관찰할 수 있는 방법을 개발하였으며 R 펩타이드가 절단된 비리온이 세포감염 없이 세포와 세포 사이의 융합을 매개할 수 있음을 밝혔다.

Key words □ envelope protein, murine leukemia virus, R peptide, syncytium

레트로바이러스의 침입은 바이러스 표면의 당단백질이 숙주세포막과 바이러스막 사이의 융합을 중재함으로써 일어난다(1, 12, 26). 레트로바이러스의 외막 당단백질은 전구체(precursor molecule)로 합성이 되며 이형이합체(heterodimer)가 3합체(trimer)로 존재한다. 외막 당단백질 전구체가 세포내의 프로티아제에 의해 표면 단백질(SU: surface protein)과 막단백질(TM: transmembrane protein)로 나누어진다. SU는 수용체와 결합하는 부위이고 TM은 당단백질을 외막에 고정 시키는 역할을 한다(2, 7).

외막 바이러스의 서로 다른 융합 기전이 밝혀졌는데 인플루엔자 바이러스 같은 경우는 낮은 pH가 융합을 촉진 시키는 인자이다. 레트로바이러스는 중성 pH에서 융합이 일어나는데 가장 주요한 촉진인자는 수용체와의 결합이다. 수용체와의 결합은 외막 당단백질의 구조를 변화 시킴으로 숨어 있던 fusion peptide를 바깥쪽으로 노출시켜 막 융합이 일어나도록 유도한다(4).

바이러스 막 표면에 존재하는 단백질에 의한 막 융합은 바이러스의 침입을 허용할 뿐만 아니라 다양한 조건하에서 세포-세포 간의 융합을 매개하여 합포체(syncytium: multinucleated giant cell)를 형성한다(6, 18, 20). 마우스 레트로바이러스인 Moloney murine leukemia 바이러스와 Friend murine leukemia 바이러스의 당단백질부위 중 S84, D86, W102의 3개 아미노산이 수용체와

결합하는 것으로 밝혀졌으며 지금까지의 연구 결과 Friend murine leukemia 바이러스의 S84와 W102의 아미노산 변화가 합포체 형성에 관여하는 것으로 보고 되었으며, 외막 당단백질의 돌연변이 뿐만 아니라 수용체의 농도가 합포체 형성에 영향을 미친다고 알려져 있다(3, 8, 9, 24, 27).

합포체 형성은 2가지 기작에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있는데 하나의 비리온이 2개의 세포와 동시에 융합을 하거나 (fusion from without) 바이러스에 감염되어 바이러스 외막당단백질을 세포표면에 발현하는 세포가 감염되지 않은 이웃 세포와 융합하는(fusion from within) 경우이다(21). 즉 fusion from without은 바이러스의 복제가 필요 없는 반면에 fusion from within 기작은 바이러스의 Env 유전자가 발현되어야 한다.

어떤 레트로바이러스에서는 융합기작을 수용체와의 결합으로만 설명하기에는 충분하지 않다. 마우스레트로바이러스인 경우 수용체와 결합하기에 앞서 R 펩타이드가 분열되어야 한다(14, 22). R 펩타이드는 마우스레트로바이러스에서 처음 관찰되었으며 바이러스 프로티아제에 의해 절단되는 TM의 카르복시 말단 16개 아미노산을 지칭한다. 절단되는 부위에 정지 코돈을 삽입함으로써 생성되는 R 펩타이드가 없는 재조합 MLV 외막 단백질을 다른 바이러스 단백질 없이 수용체를 가진 세포에서 발현하면 큰 합포체를 형성한다. 이것으로 R 펩타이드가 없는 외막 단백질은 R 펩타이드를 가진 외막 단백질보다 막 융합능력이 증가되어 있다는 것을 알 수 있다. 즉 R 펩타이드가 막 융합을 방해하는데

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-550-3453, Fax: 82-41-550-3409
E-mail: yjung@dankook.ac.kr

(15), 융합능력이 있는 외막 단백질이 합포체를 형성하여 바이러스를 생산하는 세포를 사멸시키기 때문에 바이러스는 감염된 세포를 떠날때까지 막 융합 능력을 지연시키는 것이 유익하다고 할 수 있다. R 펩타이드는 바이러스의 성숙 과정 동안 50% 이하의 효율로 절단되는데 절단된 TM은 MuLV의 비리온에서 발견되고 R 펩타이드는 core 복합체와 결합되어 세포에서 발견되는 것으로 알려져 있으며 D-type 레트로바이러스인 Mason-Pfizer monkey virus, equine anemia virus, gibbon ape leukemia virus, spleen necrosis virus, porcine endogenous retrovirus 등의 외막 단백질에서도 R 펩타이드 분열이 융합을 촉진 시키는 것으로 밝혀졌다(22).

합포체 형성과정과 외막 단백질이 바이러스 입자에 끼어들어갈 때의 R 펩타이드 절단 부위에 존재하는 아미노산의 기능을 밝히기 위해 돌연변이된 외막 단백질을 만들거나 R 펩타이드가 절단되고 난 후의 막 인접 세포질쪽 부위에 대한 연구가 이루어지고 있다(13, 23). 최근의 연구에서는 R 펩타이드 절단이 SU-TM 복합체의 S-S 결합 이성체화를 촉진하여 바이러스의 외막과 숙주세포막의 융합에 관여하는 것으로 보고 되었다(16, 25).

세포-세포간의 융합을 측정하는 고전적인 방법은 합포체를 발견하는 것이나 이 방법은 융합 pore가 충분히 커야 하며 염색을 해야 하는 등 여러 가지 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 합포체 형성 기작과 바이러스의 침입 기작을 쉽고 빠르게 측정하기 위해 SU의 PRR 부위에 EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein)를 가지고 있고 R 펩타이드가 없는 full length molecular clone을 만들었으며 R 펩타이드가 없는 외막 단백질을 가진 비리온이 어떤 방식으로 합포체를 형성할 수 있는지를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

Plasmid

MoMLV full length molecular clone을 가진 pMoMLV와 R 펩타이드가 절단된 Moloney envelope 단백질 발현 플라스미드인 pCEETR은 Dr. J. Silver (NIAID, USA)로부터 분양받았다. pCEETR의 PRR (proline rich region)에 EGFP를 삽입하는 것은 pEGFP-N1 (Clontech) 벡터에서 EGFP 유전자를 증폭한 후 pCEETR의 *SgrAI* 위치에 클로닝하였다(5).

EGFP를 가진 full length molecular clone 제조

pBR322 벡터에 클로닝된 MoMLV full length clone의 envelope에 EGFP 유전자를 삽입하기 위해 먼저 pcDNA3.1(-) 벡터(Invitrogen)에 MoMLV의 *pol* 일부와 *env* 유전자를 포함하는 *Hind-Hind* 조각을 클로닝하였다.

pCEETR 벡터의 MoMLV *env* PRR에 EGFP를 삽입한 후 (pCEETR-EGFP) *HpaI*를 처리하여 EGFP를 포함하는 *HpaI-HpaI* 조각을 pcDNA3.1(-)에 클로닝된 *env* 유전자의 조각과 바꾸어 주었다. 이 plasmid를 *SacII*와 *EcoRI*를 이용하여 full length molecular clone을 가진 pBR322의 같은 제한효소 부위와 대치하

였다(pBR322MLV-EGFP).

레트로바이러스의 프로모터 보다 강력한 CMV 프로모터를 가진 full length molecular clone을 만들기 위해 레트로바이러스 벡터인 pCLXSN (Imgenex)을 *EagI*를 처리한 후 packaging 시그널을 가지고 있는 Moloney 바이러스의 *EagI* 조각으로 바꾸어 주었다. 이 plasmid를 *SalI*과 *NheI*를 처리하여 EGFP를 가진 envelope으로 대치하여 CMV 프로모터를 가진 replication competent molecular clone (pCLXSN-MLV-EGFP)을 제조 하였다.

R-peptide가 절단된 full length molecular clone의 제조

합포체 관찰을 위해 pCLXSN-MLV-EGFP의 envelope에서 R 펩타이드를 제거하고자 하였다. pCEETR-EGFP의 R 펩타이드가 제거된 부분(R(-))을 pCLXSN-MLV-EGFP에 삽입하기 위해 pCEETR-EGFP를 *EcoRI-BglII*를 처리하였고 *EcoRI-BglII* 조각을 pIRES2-EGFP 벡터(Clontech)에 삽입하였다. 이 plasmid를 *NsiI*과 *NheI*를 처리한 후 pCLXSN-MLV-EGFP의 *NheI-NsiI* 조각과 교체 하였다(pCLXSN-MLV-EGFP-R(-)).

Syncytium 형성

완성된 DNA의 발현에 따른 합포체를 관찰하기 위하여 transfection 전 날 6 well plate에 NIH3T3 세포를(1×10^5 cells/dish) 배양한 후 CalPhosTM mammalian transfection kit (Clontech)와 polyfect (Qiagen)를 사용하여 transfection을 실시하였다. 2일이 지난 후 매일 dish를 꺼내어 합포체 형성 여부를 관찰 하였으며 transfection에 의해 형성된 비리온에 의한 합포체 형성 여부는 293 세포주에 transfection한 후 2일째에 상층액을 얻어 상층액 1ml과 polybrene (Hexadimethrine bromide, Sigma) 20 μ l (10 μ g/ml)를 새로운 NIH3T3 세포에 감염 시켜 광학 현미경과 형광 현미경을 사용하여 합포체 생성 유무를 관찰 하였다.

결과 및 고찰

바이러스의 외막 당단백질은 수용체에 부착하여 숙주 세포막과 융합하는데 필수적인 역할을 하고 있으며 바이러스의 침입과정에서의 당단백질의 역할은 비교적 자세하게 밝혀졌다(11). 그러나 에너지학적으로 불리한 반응인 숙주 막과 바이러스 막 사이의 지질 혼합 기작은 중요한 의문으로 남아 있다. MoMLV TM의 카르복시 말단 16개 아미노산(617-632번; 외막 단백질 전체 아미노산 갯수는 632 개)은 R 펩타이드로 알려져 있는데 R 펩타이드의 절단이 외막 당단백질에 의한 바이러스의 침입에 필수적이다. R 펩타이드가 막융합을 억제하는 기작은 잘 알려져 있지 않으며 616번 아미노산(leucine)과 617번 아미노산(valine)이 R 펩타이드 절단 위치이다. 이 절단 위치 주변에 있는 아미노산 중 어떤 아미노산이 막융합 억제에 관여하는지 밝히기 위해 특정 아미노산을 돌연변이 시키는 연구와 R 펩타이드가 절단된 후 남아 있는 TM의 막 가까운 세포질쪽 부위(598-616번 아미노산)의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(23). 최근 연구에서는 SU-TM 복합체의 내부소단위 간 이황화 결합의 이성체화

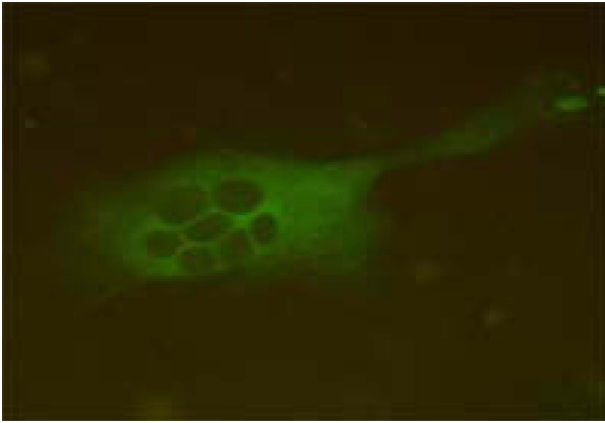


Fig. 1. Syncytium formation in murine NIH3T3 cells. NIH3T3 cells were transfected with an envelope expression vector encoding the truncated ecotropic envelope (pCEETR-EGFP). Cells were photographed under a fluorescence microscope. Objective lens magnification was $\times 20$.

(isomerization)에 의해 융합이 조절될 수 있으며 R 펩타이드가 *in vitro*와 *in vivo* 분석 시험에서 이성질체화 반응을 억제하는 것으로 밝혀졌다(16). 또한 R(-)에 의한 막융합 정도와 형질도입 (transduction) 효율에 있어서 R(+) 외막 단백질의 영향을 분석한 결과 바이러스 외막에 R(-)와 R(+)가 혼합되어 있으면 R(-)만 포함하는 바이러스보다 낮은 융합성과 낮은 형질 도입 효율을 나타내는 것으로 알려졌다(13). R(-)는 R 펩타이드가 절단되어 존재하지 않는 것을 나타내며 R(+)는 R 펩타이드가 존재한다는 것을 의미한다.

기존 연구에서는 막융합 정도를 알아보기 위해 단순히 광학 현미경을 사용하여 눈으로 합포체를 관찰하거나 염색을 하여 관찰하였는데 이러한 방법은 정상 상태에서도 관찰되는 합포체와의 구분이 어렵고 염색하는데도 시간이 걸리는 등 관찰에 어려움이 있었다. 이러한 문제를 해결하고자 본 연구에서는 합포체를 신속하고 정확하게 관찰할 수 있는 방법을 개발하고자 EGFP를

가진 R(-) envelope을 만들었다. EGFP를 바이러스의 외막 당단백질에 삽입하거나 수용체에 융합시켜 외막 당단백질과 수용체의 결합 기작을 밝히고자 하는 연구 방법은 기존에 확립되어 있다(5, 10, 17, 19). 따라서 본 연구에서는 envelope의 PRR (proline rich region)에 위치한 EGFP가 안정하게 발현이 되어 합포체 형성을 쉽게 관찰할 수 있는지 알아보기 위해 Fig. 1에서 보는 바와 같이 NIH3T3 세포주에 pCEETR-EGFP를 transfection 하여 48시간 후에 관찰하였다. 관찰 결과 세포질은 형광을 떠나 핵은 형광을 나타내지 않아 합포체 관찰이 기존의 방법보다 신속 정확하게 관찰 가능하다는 것을 밝혔으며 EGFP를 가진 *env* 유전자가 안정되게 발현되고 있음을 알 수 있었다. 위 결과를 바탕으로 바이러스가 침입하는 과정에서 R 펩타이드가 합포체 형성에 관여하는 기작을 연구하기 위해 EGFP와 R(-)를 포함하는 replication competent full length molecular clone을 만들었으며 이 clone을 NIH3T3 세포주에 transfection 하였을 때 시간이 지나면서 합포체 형성 숫자가 늘어났고 더 많은 수의 핵이 합포체 형성에 관여 하였다(Fig. 2). 이러한 현상은 이 clone이 복제를 하면서 더 많은 바이러스를 만들어 합포체 형성에 관여하기 때문일 것으로 생각된다. 처음에는 replication competent full length molecular clone으로 pBR322MLV-EGFP를 사용하였으나 형광을 약하게 띄어 CMV 프로모터를 가진 pCLXSN-MLV-EGFP를 제조하였다.

합포체(syncytium) 형성이 바이러스-세포간 융합(fusion from without) 때문인지 세포-세포간 융합(fusion from within) 때문인지 알아보기 위해 replication competent full length molecular clone (pCLXSN-MLV-EGFP)을 293 세포주에 transfection을 하여 48시간 후에 상층액을 얻었으며 이 상층액으로 NIH3T3 세포주를 감염시켰을 때 광학 현미경으로 합포체를 형성하는 것은 관찰 하였으나(Fig. 3A) 이 세포주를 형광 현미경으로 관찰 하였을 때는 형광을 띄지 않았다(Fig. 3B). 이러한 연구 결과는 바이러스-세포간 융합(fusion from without)에 의해서 합포체가 형성되는 것으로 R(-) envelope을 가진 바이러스 입자가 감염을 일으키

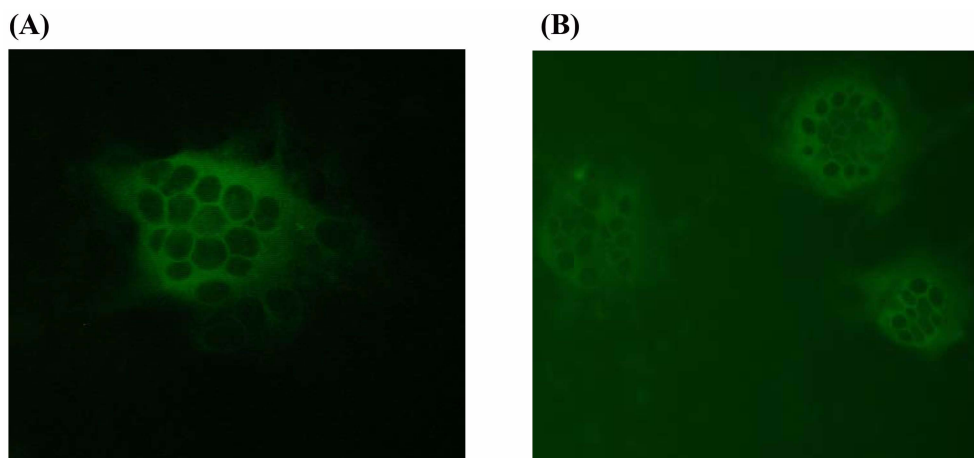


Fig. 2. Generation of replication-competent GFP-Env(R-) bearing viruses. NIH3T3 cells were transfected with pCLXSN-MLV-EGFP-R(-) encoding GFP in its truncated envelope. Transfected NIH3T3 cells showed multi nucleated giant cells (A). In passage 3, more extensive syncytia were observed (B). Cells were photographed under a fluorescence microscope. Objective lens magnification was $\times 20$.

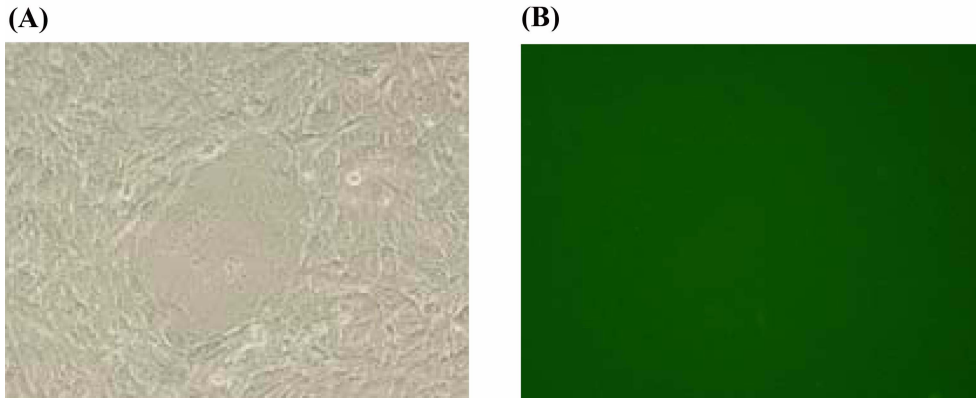


Fig. 3. Viruses fuse cells by virus-cell fusion mechanism (fusion from without). Supernatants of full length molecular clone transfected 293 cells was transferred onto NIH3T3 cells. Two days after inoculation, the cells were photographed under a light microscope (A), and a fluorescence microscope (B). Objective lens magnification was $\times 20$.

지 않으면서 세포들을 끌어 모으는 중재 역할을 한 것으로 생각된다. 합포체 형성 숫자가 많지 않은 것은 R(-) envelope 단백질이 R(+) envelope 단백질과는 달리 바이러스 입자 내에 삽입되는 효율이 낮기 때문이다.

이상의 연구결과 EGFP와 R(-)를 포함하는 replication competent full length molecular clone이 신속 정확하게 합포체 형성 여부를 판단할 수 있게 하여 이 clone이 합포체 형성기작 연구에 유용하며 R(-) envelope을 가진 바이러스 입자는 감염을 일으키지 않으면서 합포체를 형성할 수 있음을 밝혔다.

감사의 말

이 연구는 2008년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Albritton, L.M., J.W. Kim, L. Tseng, and J.M. Cunningham. 1993. Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J. Virol.* 67, 2091-2096.
- Anderson, K.B. and H. Skov. 1989. Retrovirus-induced cell fusion is enhanced by protease treatment. *J. Gen. Virol.* 70, 1921-1927.
- Chung, M., K. Kizhatil, L.M. Albritton, and G.N. Gaulton. 1999. Induction of syncytia by neuropathogenic murine leukemia viruses depends on receptor density, host cell determinants, and the intrinsic fusion potential of envelope protein. *J. Virol.* 73, 9377-9385.
- Eckert, D.M. and P.S. Kim. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 777-810.
- Erlwein, O., C.J. Buchholz, and B.S. Schnierle. 2003. The proline-rich region of the ecotropic Moloney murine leukaemia virus envelope protein tolerates the insertion of the green fluorescent protein and allows the generation of replication-competent virus. *J. Gen. Virol.* 84, 369-373.
- Germain, E., V.G. Roulin, J. Qiao, P.O. de Campos Lima, and M. Caruso. 2005. RD114-pseudotyped retroviral vectors kill cancer cells by syncytium formation and enhance the cytotoxic effect of the TK/GCV gene therapy strategy. *J. Gene Med.* 7, 389-397.
- Jones, J.S. and R. Risser. 1993. Cell fusion induced by the murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67, 67-74.
- Jung, Y.T. and C.A. Kozak. 2003. Generation of novel syncytium-inducing and host range variants of ecotropic Moloney murine leukemia virus in *Mus spicilegus*. *J. Virol.* 77, 5065-5072.
- Jung, Y.T., T. Wu, and C.A. Kozak. 2004. Novel host range and cytopathic variant of ecotropic Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 78, 12189-12197.
- Katja, S., O. Erlwein, B. Alexandra, and B.S. Schnierle. 2004. Murine leukemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins. *Virology* 1, 14.
- Kielian, W.J. and A. Helenius. 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* 16, 151-195.
- Kim, J.W., E.I. Closs, L.M. Albritton, and J.M. Cunningham. 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.
- Kubo, Y., C. Tominaga, H. Yoshii, H. Kamiyama, C. Mitani, H. Amanuma, and N. Yamamoto. 2007. Characterization of R peptide of murine leukemia virus envelope glycoproteins in syncytium formation and entry. *Arch. Virol.* 152, 2169-2182.
- Kubo, Y. and H. Amanuma. 2003. Mutational analysis of the R peptide cleavage site of Moloney murine leukaemia virus envelope protein. *J. Gen. Virol.* 84, 2253-2257.
- Li, M., Z.N. Li, O.Z. Yao, C.L. Yang, D.A. Steinhauer, and R.W. Compans. 2006. Murine leukemia virus R peptide inhibits influenza virus hemagglutinin-induced membrane fusion. *J. Virol.* 80, 6106-6114.
- Löving, R., K. Li, M. Wallin, M. Sjöberg, and H. Garoff. 2008. R-Peptide cleavage potentiates fusion-controlling isomerization of the intersubunit disulfide in Moloney murine leukemia virus Env. *J. Virol.* 82, 2594-2597.
- Masuda, M., N. Kakushima, S.G. Wilt, S.K. Ruscetti, P.M. Hoffman, A. Iwamoto, and M. Masuda. 1999. Analysis of receptor usage by ecotropic murine retroviruses, using green fluorescent protein-tagged cationic amino acid transporters. *J. Virol.* 73, 8623-8629.
- Murphy, S.L., M. Chung-Landers, M. Honczarenko, and G.N. Gaulton. 2006. Linkage of reduced receptor affinity and superinfection to pathogenesis of TR1.3 murine leukemia virus. *J. Virol.*

- 80, 4601-4609.
19. Ou, W. and J. Silver. 2003. Role of a conserved amino-terminal sequence in the ecotropic MLV receptor mCAT1. *Virology* 308, 101-108.
 20. Park, B.H., B. Matuschke, E. Lavi, and G.N. Gaulton. 1994. A point mutation in the *env* gene of a murine leukemia virus induced syncytium formation and neurologic disease. *J. Virol.* 68, 7516-7524.
 21. Pinter, A., T.E. Chen, A. Lowey, N.G. Cortez, and S. Silagi. 1986. Ecotropic murine leukemia virus-induced fusion of murine cells. *J. Virol.* 57, 1048-1054.
 22. Ragheb, J.A. and W.F. Anderson. 1994. pH-Independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion : implications for the role of the R peptide and p12ETM in viral entry. *J. Virol.* 68, 3220-3231.
 23. Rozenberg-Adler, Y., J. Conner, H. Aguilar-Carreno, S. Chakraborti, D.S. Dimitrov, and W.F. Anderson. 2008. Membrane-proximal cytoplasmic domain of Moloney murine leukemia virus envelope tail facilitates fusion. *Exp. Mol. Pathol.* 84, 18-30.
 24. Siess, D.C., S.L. Kozak, and D. Kabat. 1996. Exceptional fusogenicity of Chinese hamster ovary cells with murine retroviruses suggests roles for cellular factor(s) and receptor clusters in the membrane fusion process. *J. Virol.* 70, 3432-3439.
 25. Wallin, M., M. Ekström, and H. Garoff. 2004. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J.* 23, 54-65.
 26. White, J., M. Kielian, and A. Helenius. 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* 16, 151-195.
 27. Wong, P.K.Y., P.H. Yuen, and S.J. Kaufman. 1977. Induction of syncytia by Moloney murine leukemia virus in myoblasts defective in differentiation. *J. Virol.* 21, 319-327.

(Received April 22, 2009/Accepted July 6, 2009)

ABSTRACT : Construction of a Fluorescently Labeled Infectious R Peptide-Less Moloney MLV Molecular Clone for Analysis of Syncytium

Yong Jin Lee, Jin Woo Park, Kyu Jun Lee, Eun Hye Bae, Sung-Han Park, Ji Hyun Lim, Sae Ro Mi Kim, and Yong-Tae Jung* (Department of Microbiology and Institute of Basic Science, College of Advanced Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea)

Retroviruses enter host cells by membrane fusion between the viral Env proteins on the virus membrane and a virus receptor on the cellular membrane. The envelope protein of the ecotropic Moloney murine leukemia virus is synthesized as a gp85 precursor and is proteolytically cleaved into an extracellular surface unit (SU) and the transmembrane protein (TM). The cytoplasmic tail (16 amino acid; R peptide) of the TM protein is further cleaved by the viral protease during virion maturation. Unlike the wild type Env protein bearing the R peptide, R peptide-truncated Envelope induces syncytia in susceptible cells. To understand the mechanism of R peptide-truncated Env in syncytium formation, R peptide-truncated Env expressing full-length molecular clone containing EGFP in PRR (proline rich region) of Env was constructed. This molecular clone induced syncytia in transfected NIH3T3 cells, fluorescence was detected in the cytoplasm and at the plasma membrane, while the nuclei did not stain and appeared black by fluorescence microscopy. Interestingly, virions with truncated envelope produced from transfected NIH3T3 cells induced syncytia in NIH3T3 cells, but fluorescence was not detected in the same infected cells. It is believed that cell-free viruses direct the fusion of neighboring cells without infection. Our data suggests that use of EGFP-tagged envelope for monitoring syncytium is a sensitive and convenient method. We also found that virion incorporated the R peptide-truncated Env is able to induce the formation of syncytia by fusion from without.