

(S3-A)

Murine Parvovirus의 전사 조절에 관한 분석

안 정 근

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

서 론

Minute Virus of Mice (MVM) 은 *Parvoviridae* 과에 속하는 작은 DNA 바이러스이다. Parvovirus는 겹껍질이 없는 정 20면체 입자로 구성되어 있으며 지름은 약 20-25 nm 이며 약 5 kb (kilobase)인 한 가닥의 DNA 유전자를 가지고 있다. MVM 유전자의 양쪽 끝에는 바이러스의 한가닥 유전자를 두가닥으로 복제하는데 필요한 palindromic sequence가 있다. 이 바이러스는 숙주 동물의 발생 과정에서 빨리 분화하는 S phase 세포들을 선택적으로 파괴하여 숙주 동물의 선천적인 기형을 유발하고 있다. 그리고 배양된 세포에서 나타나는 MVM의 선택적인 감염이 전사 단계에서 결정된다는 증거들이 있어 이 바이러스의 전사 조절의 기작을 연구하는 것은 매우 중요하다.

MVM 바이러스의 전사 구조 (transcription organization)는 간단하여 유전자 지도의 map unit 4 위치 그리고 map unit 38 위치에 전사 개시되는 서로 겹쳐지는 두 개의 전사 단위 (transcription unit)를 가지고 있으며 map unit 95 위치에서 polyadenylation이 된다. 각각의 전사 단위는 P4 promoter 와 P38 promoter를 가지고 있다 (그림 1). P4 전사 단위로부터는 두 개의 비구조 단백질 (nonstructural proteins)인 NS-1 와 NS-2을 code하는 R1 그리고 R2 mRNA가 만들어지고 P38 전사 단위에서는 바이러스의 껍질 단백질 (capsid protein)인 VP-1과 VP-2를 code하는 R3 mRNA가 만들어진다. Productive infection 의 경우 이 바이러스는 먼저 R1과 R2 viral mRNA (각각 전체 바이러스 RNA의 10-20 %)를 합성하고 그 후에 R3 message (65-70 %)를 합성한다.

P4 promoter와 P38 promoter는 모두 진핵세포의 유전자에서 자주 발견되는 AT의 염기 배열이 많은 TATA box와 GC 염기 배열이 많은 GC box를 포함하고 있다.

P4 promoter는 GC box와 TATA box가 매우 가까이 위치하며 특히 GC box는 SV40 enhancer sequence와 adenovirus E1A enhancer와 유사한 sequence와 겹쳐서 위치하고 있다. P38 promoter는 CAAT box를 포함하고 있으며 또한 H-1 parvovirus에서 알려진 transactivation responsive 요소 (H-1 TAR)와 매우 흡사한 sequence가 있다.

MVM 바이러스의 전사 조절 메커니즘을 분석하기 위하여 각 promoter의 DNA cis-elements를 돌연변이 분석을 통하여 확인하였다. 따라서 각 promoter의 5' deletion 과 internal deletion 그리고 linker scanning mutant를 제조하였고 숙주 세포인 A92L 에서의 *in vitro* 와 *in vivo* promoter activity를 확인 분석하였다.

재료 및 방법

P4 promoter 의 mutants 제조

PMM 984는 전체 MVM 유전자를 가지고 있는 감염성이 있는 clone이다. PMM 984로부터 P4 promoter를 가지고 있는 Bam HI-Pst I fragment(nt 1 에서 nt 415)를 분리하여 pBluscript vector에 subclone 하여 pMB 415를 제조하였다.

5' deletion mutants를 제조하기 위하여 pMB 415를 Sac I과 Bam HI 제한 효소로 이중 분해하고 exonuclease III을 이용하여 Bam HI 자리로부터 한 쪽으로 deletion을 만들었다. Exonuclease III의 반응 속도를 변화시켜 일련의 5' deletion을 만든 후 mung bean nuclease를 처리한다. 10 bp의 Bgl II linker(5'-GAAGATCTTC-3')를 plasmid의 양 끝에 ligation 한 후 과다하게 붙은 linker를 Bgl II 제한 효소를 이용하여 제거한다. 양 끝의 Bgl II linker 자리를 intramolecular ligation하여 일련의 P4 promoter의 deletion mutants를 제조하였다.

3' deletion mutants는 pMB 415을 Apa I 과 Hind III로 분해하고 Exo III/mung bean nuclease로 deletion 한 후 Bgl II linker를 붙였다. 5' deletion 과 3' deletion mutants의 deletion end point는 DNA sequencing으로 확인하였다.

Linker scanning mutants는 일련의 5' deletion mutants 와 3' deletion

mutants 중 deletion 된 끝이 Bgl II linker의 크기인 10 bp 만큼 떨어진 5' 그리고 3' deletion mutants를 이용하여 제조하였다.

Nuclear extract 의 준비

쥐의 A9 fibroblast(표피세포)와 인간의 HeLa 세포를 suspension culture 한 후 각각의 세포를 분쇄기로 세포막을 파괴한 후 세포의 핵을 원심분리하였다. 고장성 완충용액으로 핵 속의 단백질을 추출하여 nuclear extract로 사용하였다. 각 세포의 nuclear extract의 전사 활동도를 확인하기 위하여 *in vitro* run off 전사 방법을 이용하였다.

Primer extension 분석

DNA template로 부터 세포의 nuclear extract를 이용하여 *in vitro* 전사 반응을 수행하였다. 생성된 RNA를 전사되는 DNA template 에 상보적이고 5' 끝이 P32로 표지된 oligonucleotide와 hybridization 하였다. Primer 와 RNA 의 hybrid를 reverse transcription buffer에 현탁시킨 후 reverse transcriptase를 첨가하여 42°C에서 30 분간 반응시킨다. 생성된 cDNA를 8 % polyacrylamide sequencing gel에서 전기영동하여 분석하였다. pMBΔ142를 T7 RNA polymerase 로 생성한 RNA를 primer extension 분석에서 사용한 것과 같은 끝이 표지된 oligonucleotide로 hybrid시킨 후 dideoxy sequencing 반응의 조건에서 reverse transcriptase 를 이용하여 만들어진 cDNA fragments를 sequencing marker로 사용하였다.

DNase 1 footprinting 분석

Noncoding strand의 probe를 만들기 위하여 pMB 415을 Bam HI으로 자른 후 5' 말단을 P32로 표지시켰다. 방사성 동위원소로 표지된 plasmid를 Nco 1(nt 260)으로 다시 자른 후 표지된 Bam HI-Nco 1 fragment를 agarose gel 상에서 분리하였다. Coding strand의 probe는 pMB 415을 Nco 1으로 자른 후 5' 말단을 표지시킨 다음 Bam HI으로 다시 잘라서 준비하였다. *In vitro* 전사 조건에서 nuclear extract와 각각의 probe를 넣고 반응시켰다. 반응 혼합물을 DNase 1으로 처리한 후 polyacrylamide sequencing gel로 분석하였다. 같은 방사성 동위원소를 표지

된 probe를 Maxam-Gilbert sequencing 반응을 시켜 sequencing marker로 사용하였다.

Gel retardation 분석

MVM 바이러스의 P4 promoter 중 TATA box를 제외하고 GC box와 이에 겹치는 adenovirus 의 E1A enhancer 와 SV40 enhancer sequence를 포함하는 상보적인 oligonucleotide(nt 137-nt 170)를 합성하고 hybrid시킨 후 5' 양 끝을 P32로 표지하여 probe로 사용하였다. Competition 반응을 위하여 각각의 motif를 포함하는 DNA fragment와 P4 promoter의 internal deletion 그리고 linker scanning mutants를 supercoil형태의 plasmid를 competitor로 사용하였다. *In vitro* 전사 반응 조건 하에서 4 fmol의 표지된 probe와 1 μ g의 poly(dI-dC) 그리고 각기 다른 양의 competitor DNA를 혼합한 후 4 μ g의 nuclear extract를 첨가하여 30°C에서 30 분간 반응을 진행시킨다. 각각의 반응 혼합물을 4%의 nondenaturing polyacrylamide gel로 전기 영동한 후 분석한다.

P38 promoter의 mutants 제조

pMM984로 부터 Eco R1-Hind III fragment(nt 1085-nt 2650)를 분리하고 pBluscript vector에 subclone하여 P38 promoter를 갖는 P38RH plasmid를 제조하였다. EcoR1-HindIII fragment는 P38 promoter와 645 bp의 coding sequence를 가지고 있다. P38 promoter의 5' deletion mutants를 만들기 위하여 P38RH를 BsmI로 자른 후 Bal31 exonuclease로 deletion시키고 EcoR1으로 처리하여 deletion된 자리로부터 5' 위치에 있는 sequence를 제거하였다. Klenow fragment로 deletion된 말단을 blunt로 만든 후 BglII linker를 deletion된 말단에 붙이고 intramolecular ligation을 하여 5' deletion mutants를 만들었다. 3' deletion mutants는 P38RH를 XhoI으로 자른 후 Bal31으로 deletion시키고 HindIII로 처리하여 만들었다. Linker scanning mutants는 적당한 5' deletion 과 3' deletion mutants의 쌍을 이용하여 제조하였다.

P38 promoter의 LS CAT mutants의 제조

Wild type 혹은 linker scanning mutant의 P38 promoter를 갖는 *in vivo* reporter plasmids를 만들기 위하여 pSV2CAT 과 P38RH 그리고 P38 linker scanning mutants를 사용하였다. pSV2CAT이 가지고 있는 SV40 enhancer 와 SV40 early promoter를 제거하기 위하여 pSV2CAT의 AccI자리를 XbaI으로 치환하여 pSV2CAT-XbaI를 만들었다. 따라서 pSV2CAT-XbaI를 HindIII와 XbaI으로 이중 분해하여 SV40 enhancer 와 SV40 early promoter를 자른 후 P38 promoter를 갖는 fragment를 분리하였고 blunt한 말단을 만들기 위하여 klenow fragment로 처리하였다. p38RH와 p38 linker scanning mutant plasmids를 DdeI으로 처리하고 바이러스의 coding sequence 와 translation initiation codon을 제거하기 위하여 이 fragment를 다시 XbaI으로 자른 후 P38 promoter 만을 갖는 fragment를 분리한다. pSV2CAT-XbaI을 HindIII로 자른 후 klenow fragment로 처리하여 blunt한 말단을 만들고 다시 XbaI으로 처리하여 만들어진 CAT 유전자를 지닌 vector에 P38 promoter 혹은 linker scanning promoter를 subcloning하여 wild type 과 linker scanning mutant p38CAT plasmid를 제조하였다.

DNA transfection

MVM 바이러스의 숙주세포인 쥐의 표피세포 A92L 1.5×10^6 개를 10 cm 조직 배양 접시에 넣고 10 %의 어린 소 혈청을 갖는 DMEM 배양액을 넣어 전체 부피가 10 ml이 되도록한다. CO₂ 배양기에서 하루동안 배양한 다음 40 μ g의 CAT plasmid 와 1 μ g의 pKONS-1/NS-2 plasmid를 에틸알콜로 침전시킨 후 40 μ l의 TBS (Tris-buffered saline)에 재현탁시킨다. 배양접시에서 배양액을 제거한 후 10 ml의 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한다. 새로이 4 ml의 DMEM 배양액을 배양접시에 넣는다. TBS에 녹아 있는 10 mg/ml 농도의 DEAE-dextran 80 μ l를 40 μ l의 DNA 용액에 첨가하여 만든 DNA/DEAE-dextran 혼합물을 배양접시에 가한다. 4 시간 동안 배양한 후 DNA/DEAE-dextran을 갖고 있는 배양액을 제거하고, 5 ml의 10 % DMSO (dimethyl sulfoxide)를 가한 후 1 분 간 shock을 준 후 PBS로 세척하고 DMEM 배양액을 넣고 CO₂배양기에서 이틀동안 배양한다. 배양 후 세포를 cell scraper로 세포를 긁어낸 후 세포막을 파괴하기 위하여 얼리고 녹이는 작업

을 3 번 반복한다. 녹은 세포를 microcentrifuge하고 그 상층액을 취하여 -70 °C에 보관한다. 이 상층액을 cell extract로 쓴다.

CAT assay

1 μ l의 C^{14} -chloramphenicol, 3 μ l의 40 mM acetyl-CoA, 32.5 μ l의 1M Tris-Cl (pH 7.5) 그리고 93.5 μ l의 H_2O 이 들어 있는 혼합액에 20 μ l의 cell extract를 가한다. 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 1 ml의 ethylacetate를 첨가하여 반응을 중지시킨다. Vortex를 이용하여 섞은 후 microcentrifuge하여 유기층과 수용액층을 분리한다. 분리된 유기층을 진공 건조시킨 후 30 μ l의 ethylacetate로 현탁하고 시료의 10 μ l를 silica TLC판 (Whatman PESILG)에 spotting한다. TLC 판을 19:1 chloroform/MeOH (vol/vol) 용매가 채워진 용기에 넣어 판막 크로마토그래피를 한다. TLC판을 공기 중에서 건조한 후 autoradiogram을 만든다. C^{14} -chloramphenicol(CM), 1-acetyl- C^{14} - chloramphenicol (1-Ac CM), 3-acetyl- C^{14} - chloramphenicol (3-Ac CM)의 radioactivity는 각각의 부위를 TLC 판에서 떼내어 scintillation counter로 확인한다. 각 cell extract의 CAT activity는 $1\text{-Ac CM} + 3\text{-Ac CM} / \text{CM} + 1\text{-Ac CM} + 3\text{-Ac CM}$ 으로 나타낸다.

결과 및 토의

P4 promoter mutants의 *in vitro* 전사 활성화도

MVM P4 promoter의 전사를 조절하는 DNA cis-요소를 확인하기 위하여 wild type의 pMB415와 5' deletion mutants 그리고 linker scanning mutants를 숙주 세포인 A92L 과 HeLa 세포의 nuclear extracts를 이용하여 *in vitro* 에서 전사를 시킨 후 primer extension 실험을 하여 각 mutants promoter의 전사 활성도를 조사하였다 (그림 3). RNA가 합성개시되는 자리는 MVM 바이러스의 3' 말단으로 부터 nt 204 와 205 bp 떨어진 부분이었다. 5' deletion mutants의 경우 전사 개시 지역으로 부터 upstream으로 53 bp 까지 deletion된 $\Delta 152$ plasmid는 wild type 인 pMB415와 같은 전사 활성도를 가지고 있었다. $\Delta 152$ plasmid는 바이러스 유전자의 3' 말단으로 부터 E1A enhancer motif 전까지 deletion된 mutant이다. E1A

enhancer motif와 GC box의 첫 번째 nucleotide가 제거된 $\Delta 159$ mutant는 약 11 %의 wild type 전사 활성도를 가지고 있었다. 대부분의 GC box sequence가 제거되었을 경우($\Delta 165$) 전사 활성도는 7 %로 감소하였다. GC box의 전체 sequence와 TATA box의 2개의 nucleotide가 제거된 $\Delta 176$ mutant는 전혀 전사 활성도가 나타나지 않았다. GC box와 TATA box 그리고 E1A enhancer와 SV40 enhancer motif가 제거된 두 개의 internal deletion mutants($\Delta 150-180$, $\Delta 142-180$)는 모두 전사 활성도가 없었다. Linker scanning mutants의 경우 LS/142-151은 wild type의 전사 활성도를 가지고 있었다. LS/142-151은 여러 DNA motif가 겹쳐지는 자리로부터 upstream 위치에 있는 10 bp의 바이러스 sequence가 치환된 mutant로 wild type과 같은 전사 활성도를 가지고 있었다. 대부분의 E1A enhancer motif 와 GC box의 첫 번째 nucleotide가 linker로 치환된 LS/150-159은 84 %의 wild type 전사 활성도를 가지고 있으며 GC box sequence가 치환된 LS/159-168은 25 %의 wild type 전사 활성도를 가지고 있었다. 그리고 TATA box sequence가 치환된 LS/171-180은 전혀 전사 활성도를 가지고 있지 않았다. 따라서 *in vitro*에서 TATA box는 P4 promoter의 필수적인 DNA cis-요소이고 GC box는 매우 중요한 요소임을 확인하였다.

P4 promoter 에서의 DNA-protein 상호 작용

P4 promoter 내에서 protein과 상호 작용을 하는 DNA sequence를 확인하고자 A9 nuclear extract를 이용하여 DNaseI footprinting 실험을 수행하였다. Coding strand 와 noncoding strand 모두 GC box에서 강한 DNA-protein 상호 작용이 확인되었으며 TATA box 에서는 DNA-protein 상호 작용이 감지되지 않았다 (그림 4). 그러나 P4 promoter의 GC box sequence는 Ad E1A enhancer 그리고 SV40 enhancer 와 서로 겹쳐 있기 때문에 과연 DNA-protein 상호 작용이 순수한 GC box sequence 와의 상호 작용인지를 확인하기 위하여 gel retardation competition 실험을 수행하였다. Probe로는 TATA box를 제외하고 GC box와 이에 겹쳐지는 motif를 포함하는 37 bp의 duplex oligonucleotide를 사용하였다. Competitor DNA 로는 P4 promoter를 포함하는 P4 homologous fragment, P4 promoter를 포함하지 않고 coding sequence 만을 포함하는 P4 heterologous fragment, 그리고 SV40 enhancer

와 SV40 GC box를 포함하는 SV40 origin fragment, SV40 GC box 만을 포함하는 fragment, SV40 enhancer 만을 포함하는 fragment 그리고 다른 바이러스의 promoter인 adenovirus의 major late promoter를 포함하는 fragment를 사용하였다. 각 competitor DNA의 양을 변화시켜 gel retardation 실험을 하였다 (그림 5). P4 promoter를 포함하는 fragment는 예상한 대로 강한 competition을 하였고 P4 heterologous fragment는 전혀 competition을 하지 않았다. SV40 origin DNA는 상당히 강한 competition을 하였으며 adenovirus의 major late promoter는 전혀 DNA-protein 상호 작용을 하지 않았다. SV40 enhancer sequence는 DNA-protein 상호 작용에 competition하지 않았고 SV40 GC box는 매우 강한 competition을 하였다. 따라서 DNA-protein 상호 작용에는 Ad E1A motif나 SV40 enhancer motif는 관여하지 않으며 GC box 만이 관여하는 것을 확인 하였다. 이 실험의 예상 밖의 결과는 6 개의 SV40 GC box를 가지는 SV40 origin DNA가 1개의 P4 GC box 보다 약한 DNA-protein 상호 작용을 보이는 것이다. 따라서 P4 GC box에 결합하는 단백질은 HeLa Sp1 과 다른 양상의 DNA-protein 상호 작용을 보이는 Sp1과 비슷하나 동일하지 않은 단백질이라고 추측을 할 수 있었다. P4 GC box 만이 DNA-protein 상호 작용에 관여하는 사실은 linker scanning mutants를 competitor DNA로 사용한 gel retardation 결과에서도 나타난다. 우선 전사 활성도를 전혀 나타내지 않았던 2개의 internal deletion mutant($\Delta 142-180$ 와 $\Delta 150-180$)는 거의 전혀 competition을 하지 않았다. 흥미로운 것은 $\Delta 150-180$ 이 $\Delta 142-180$ 에 비하여 약간 강한 competition을 갖고 있는데 가능한 이유는 nt 144에서 nt 149 사이에 존재하는 GC box와 비슷한 sequence가 DNA-protein 상호 작용에 약간 관여하기 때문이라고 추측할 수 있다. 그러나 이 GC box와 비슷한 sequence는 P4 promoter의 전사 활성도에는 전혀 영향을 미치지 않는 sequence이다. 왜냐하면 이 sequence를 linker sequence로 바꾼 LS/142-151은 wild type의 전사 활성도를 갖기 때문이다. 이 GC box 와 비슷한 sequence의 가능한 DNA-protein 상호 작용은 LS/142-151 과 LS/171-180 에서의 약간 다른 DNA-protein 상호 작용을 설명하여 준다. 즉 GC box와 비슷한 sequence를 갖는 LS/171-180 이 LS/142-151 보다 약간 강한 competition을 보이고 있다. GC box sequence가 치환된 LS/159-168 은 전혀 DNA-protein 상호 작용을 나타내고 있지 않았다. 따라서 이 실험의 결과로 P4

promoter에서 DNA-protein 상호 작용에 관여하는 DNA cis-요소는 GC box 임을 알 수 있었다.

P38 promoter의 *in vitro* 활성도

MVM 바이러스의 late promoter인 P38 promoter의 전사를 조절하는 DNA cis-요소를 확인하고자 P4 promoter의 경우처럼 5' deletion mutants와 linker scanning mutants를 *in vitro* primer extension 실험을 통하여 각각의 전사 활성도를 조사하였다 (그림 6). P38 promoter로 부터의 주된 RNA 전사 개시 자리는 nt 2005이고, nt 2006 그리고 nt 2010에서도 전사 개시가 되었다. 5' deletion mutants의 경우 H-1 TAR homologous sequence와 CAAT box가 제거된 P38-118은 wild type의 전사 활성도를 가지고 있었다. RNA 전사 개시 자리로 부터 upstream 으로 67 bp 까지 제거된 5' deletion mutant는 wild type의 전사 활성도를 가지고 있으나 GC box sequence의 2개의 nucleotide가 제거된 P38-54는 전혀 전혀 전사 활성도를 나타내지 않았다. 더욱 많이 deletion되어 GC box와 TATA box가 제거된 mutants는 모두 전사 활성도를 갖고 있지 않았다. Linker scanning mutants의 경우 H-1 TAR homologous sequence가 linker sequence로 치환된 LS-149/-139 그리고 LS-138/-127는 모두 wild type의 전사 활성도를 가지고 있으며 CAAT box가 linker로 치환된 LS-119/-108 역시 wild type의 전사 활성도를 가지고 있다(그림 7). RNA 개시 자리로 부터 -114에서 -86까지의 sequence를 치환한 linker scanning mutants는 모두 wild type과 비슷한 전사 활성도를 가지고 있다. GC box의 upstream으로 16 bp 떨어진 sequence를 치환한 LS-82/-72는 약 50 %의 wild type 전사 활성도를 가지고 있으며 LS-79/-67은 40 %의 wild type 활성도를 가지고 있다. GC box sequence의 첫 2 bp가 치환된 LS-61/-54는 전사 활성도가 거의 나타나지 않았고(wild type 활성도의 5 % 미만), 대부분의 GC box sequence가 치환된 LS-51/-42 역시 전사 활성도가 감지되지 않았다. TATA box가 치환된 LS-29/-18 또한 전사 활성도가 없었다. TATA box로 부터 downstream으로 3 bp 떨어진 10 bp의 sequence가 치환된 LS-19/-10은 놀랍게도 wild type의 전사 활성도를 가지고 있었다. RNA 개시 지역이 linker sequence로 치환된 LS-2/+7은 약 50 % 정도의 wild type 전사 활성도를 가지고 있다. RNA 개시 지역이 다른 sequence

로 치환 되었어도 전사 개시 자리가 바뀌지 않았다. RNA 개시 지역으로 부터 downstream에 위치하는 sequence를 치환하였을 경우도 wild type의 전사 활성도를 가지고 있다(LS+7/+10). 그러므로 *in vitro*에서 GC box와 TATA box는 P38 promoter에서도 필수적인 DNA cis-요소이다.

P38 promoter의 *in vivo* 활성도

*In vivo*에서의 P38 promoter의 활성도를 확인하기 위하여 wild type의 P38 promoter와 linker scanning promoter를 CAT 유전자 앞에 subcloning 하였다. 각각의 CAT plasmid를 MVM 바이러스의 숙주 세포인 A92L에 DEAE-dextran 방법으로 transfection하여 CAT assay를 하였다. Positive control로 pSV2CAT을 사용하였고 negative control로 pSV0CAT을 사용하였다. 놀라운 것은 wild type의 p38CAT을 10 μ g까지 transfection 하였으나 p38CAT의 CAT활성도는 promoter를 가지고 있지 않은 pSV0CAT과 같은 정도로 전혀 나타나지 않았다. 즉 P38 promoter의 *in vivo* 활성도는 매우 약하다는 것을 확인하였다. MVM 바이러스의 P38 promoter가 P4 전사 단위의 단백질 산물인 비구조 단백질에 의하여 transactivation이 된다는 간접적인 증거들이 있다. 따라서 MVM 바이러스의 비구조 단백질을 발현하는 pKONS-1/NS-2 plasmid를 p38CAT plasmid와 같이 cotransfection하여 P38 promoter가 transactivation 되는지 확인하였다. 4 μ g의 p38CAT에 pKONS-1/NS-2의 양을 변화시켜 cotransfection을 한 결과 p38CAT으로 부터 매우 강한 CAT 활성도가 나타났으며 SV40 enhancer와 SV40 early promoter를 갖는 pSV2CAT 보다도 강한 활성도를 보였다 (그림 8). P38 promoter가 transactivation 되는 정도는 cotransfection 한 pKONS-1/NS-2의 양에 비례하였다(pKONS-1/NS-2의 양이 0.5 μ g일때의 promoter 활성도는 약 70배로 증가하고 1 μ g 일때는 약 80배 2 μ g 일때는 약 110배 4 μ g의 경우는 220배로 증가하였다). 이러한 transactivation의 가능한 기작을 확인하기 위하여 일련의 linker scanning promoter를 갖는 LSCAT plasmid와 pKONS-1/NS-2를 같이 cotransfection 하였다. LS-163/-154CAT은 비구조 단백질 NS-1과 NS-2가 존재할 때 wild type의 p38CAT과 같은 정도로 매우 강하게 transactivation 되며 transactivation 되는 정도 또한 NS-1과 NS-2의 양에 비례하였다. 흥미있는 것은 H-1 TAR homologous sequence를 linker로 치환한

LS-149/-139 CAT과 LS-137/-127CAT이 모두 NS-1과 NS-2에 의하여 wild type과 비슷한 정도로 강하게 transactivation 되는 것이었다. CAAT box가 치환된 LS-119/-108CAT도 비구조 단백질에 의하여 강하게 transactivation 되었다. LS-163/-154CAT 부터 LS-82/-72CAT 까지의 linker scanning CAT plasmid들은 비구조 단백질에 의하여 wild type 수준으로 강하게 transactivation이 되며 LS-79/-67CAT의 경우 wild type 수준의 약 50 %정도 transactivation 되었다. GC box sequence의 2 bp가 치환된 LS-52/-43CAT과 TATA box가 치환된 LS-29/-18CAT은 비구조 단백질에 의하여 전혀 transactivation이 되지 않았다. TATA box의 downstream으로 3 bp 떨어진 10 bp의 sequence가 치환된 LS-19/-10 CAT은 wild type의 수준으로 강하게 transactivation 되었다 (그림 9). 따라서 P38 promoter의 GC box와 TATA box sequence는 비구조 단백질에 의하여 transactivation되는데 필요한 DNA cis-요소이다.

그러나 이러한 transactivation이 DNA cis-요소인 GC box나 TATA box가 비구조 단백질 NS-1과 NS-2와의 직접적이고 물리적인 결합으로 수행되리라고 추측되지는 않는다. 왜냐 하면 GC box와 TATA box에는 일반적인 전사 단백질이 결합하기 때문이다. 따라서 MVM 바이러스의 P38 promoter의 비구조 단백질에 의한 transactivation은 비구조 단백질과 일반적인 전사 단백질과의 상호 작용에 의한 간접적인 방법으로 수행되리라 사료된다.

참고 문헌

- Ahn, J. K., B. J. Gavin, G. Kumar, and D. C. Ward. 1989. Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* 63: 5425-5439.
- Astell, C. R., M. Thomson, M. Merchlinsky, and D. C. Ward. 1983. The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* 11: 999-1018.
- Clemens, K. E., and D. Pintel. 1988. The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order. *J. Virol.* 62: 1448-1451.
- Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Non-structural protein of Parvovirus B19 and Minute Virus of Mice controls transcription. *J. Virol.* 64: 387-396.
- Flint, J., and T. Shenk. 1990. Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator. *Ann. Rev. Genet.* 23: 141-161.

- Krauskopf, A., O. Resnekov, and Y. Aloni 1990. A cis downstream element participates in regulation of *in vitro* transcription initiation from the P38 promoter of minute virus of mice. *J. Virol.* 64: 354-360.
- Merchlinsky, M. J., P. J. Tattersall, J. L. Leary, S. F. Cotmore, E. M. Gardiner, and D. C. Ward. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 47: 227-232.
- Pintel, D., D. Dadachanji, C. R. Astell, and D. C. Ward. 1983. The genome of minute virus of mice, and autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res.* 11: 1019-1038.
- Ptashne, M. 1988. How eukariotic transcription activator work. *Nature.* 335: 683-689.
- Rhode, S. L., III, and S. M. Richard. 1987. Characterization of the transactivation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* 61: 2807-2815.

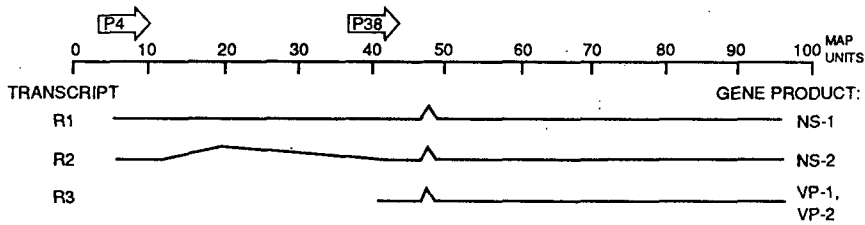


그림 1. MVM 바이러스의 전사 지도

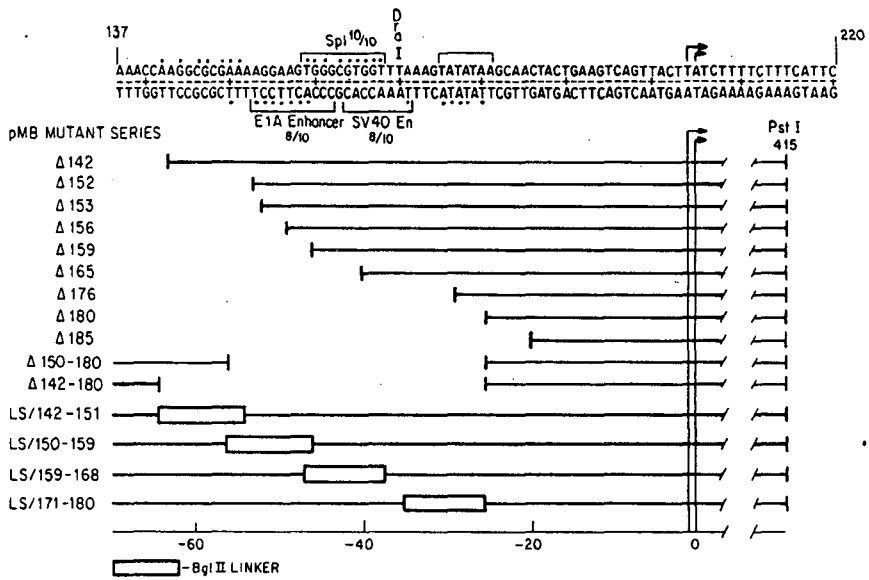


그림 2. P4 promoter의 5' deletion 과 internal deletion 그리고 linker scanning mutants

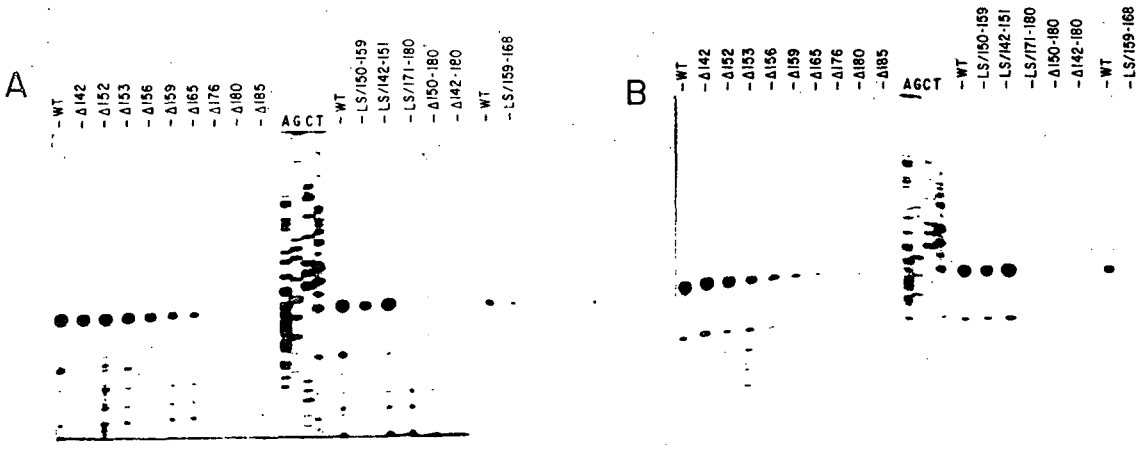


그림 3. P4 promoter mutants의 HeLa (A) 와 A92L (B) nuclear extract에서의 *in vitro* primer extension 분석

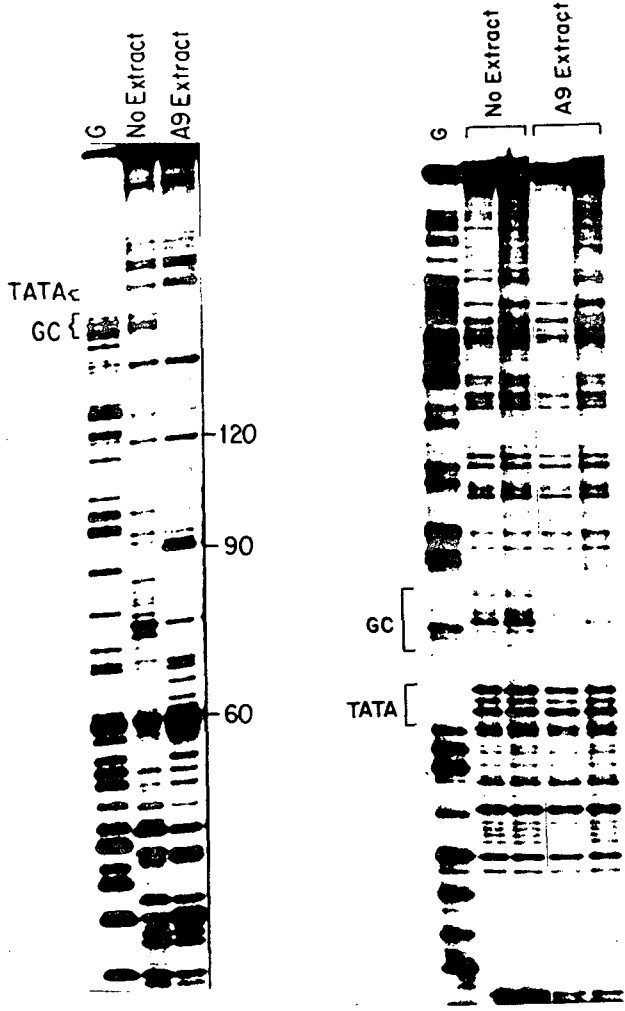


그림 4. P4 promoter coding strand (오른쪽) 와 noncoding strand의 DNase I footprinting

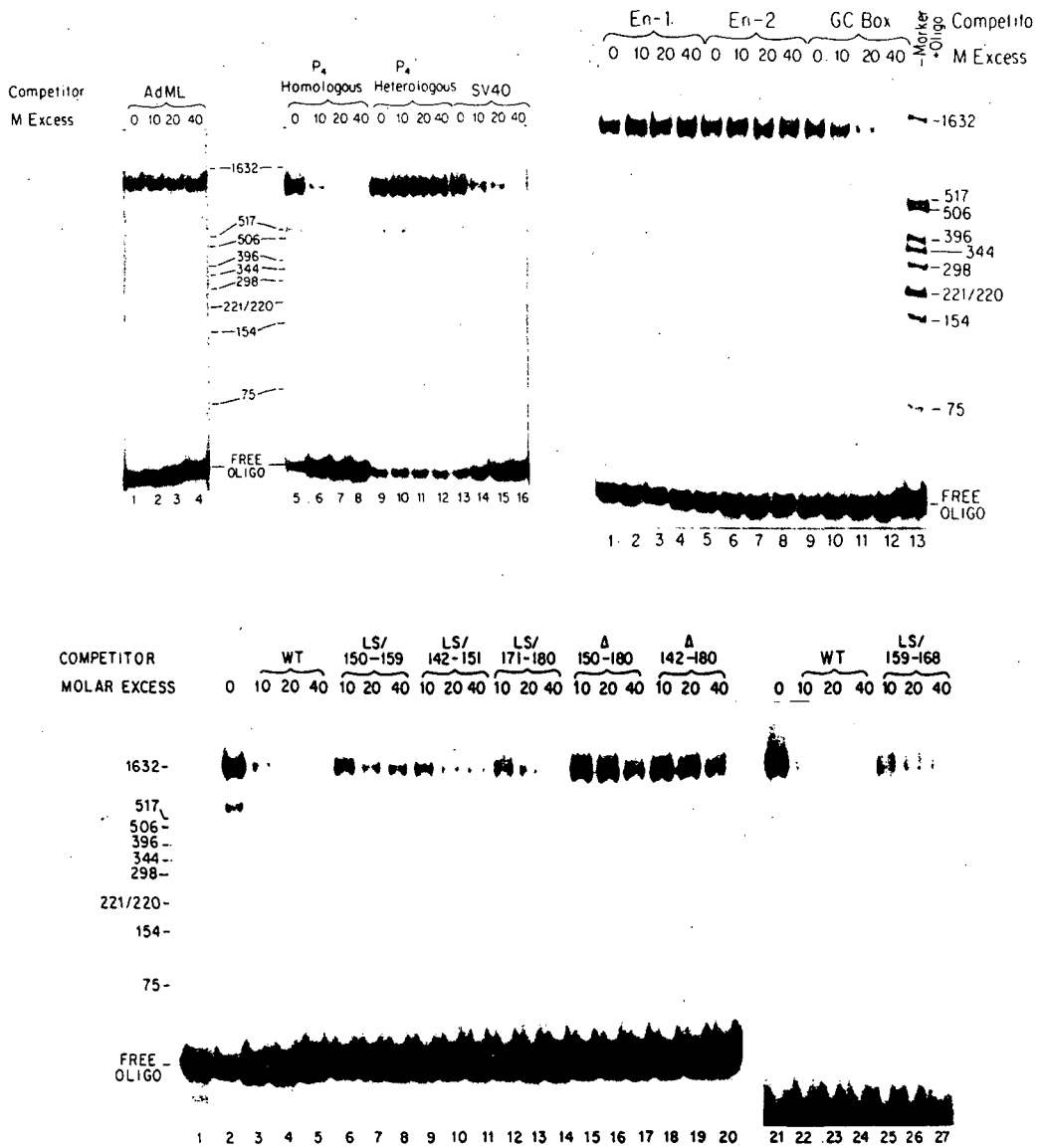


그림 5. Gel retardation competition 분석

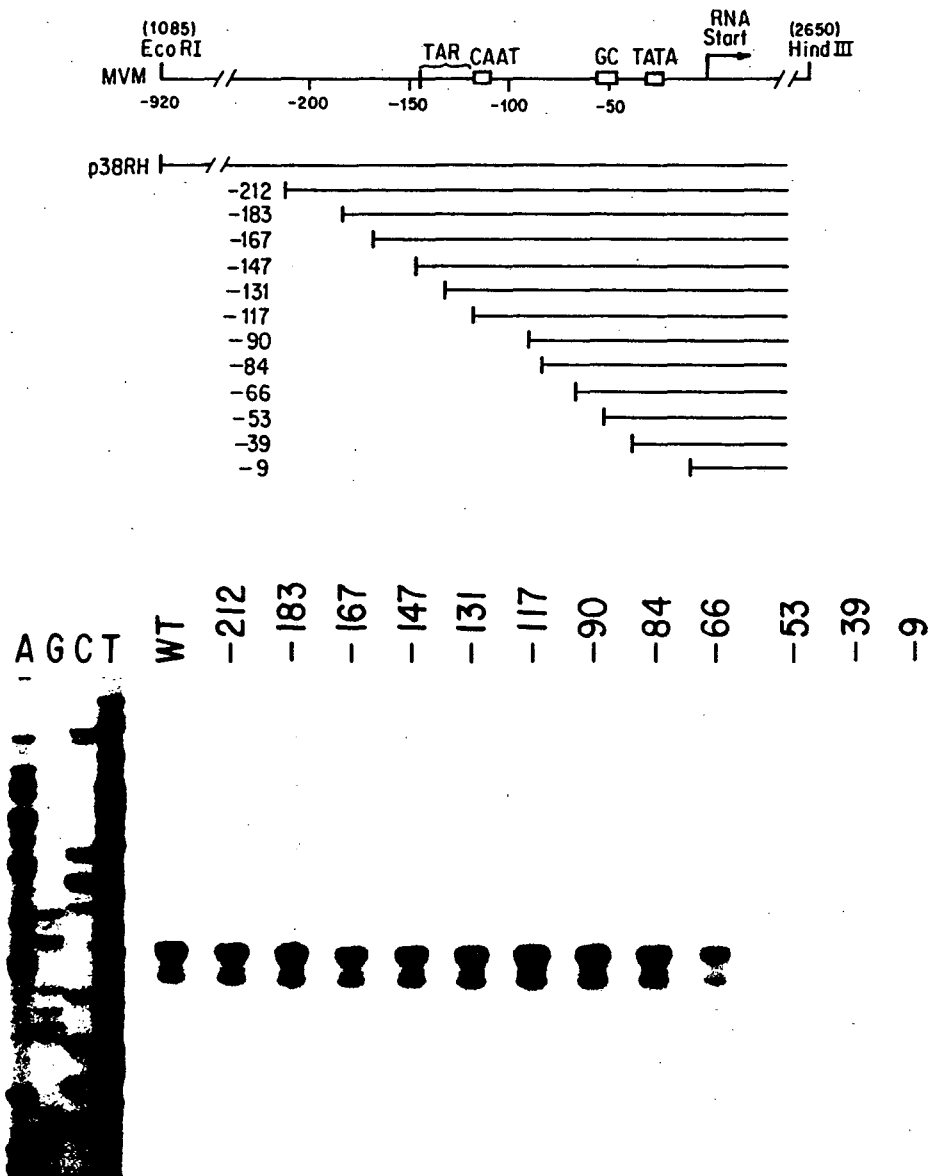


그림 6. P38 promoter의 5' deletion mutants 와 in vitro primer extension 분석

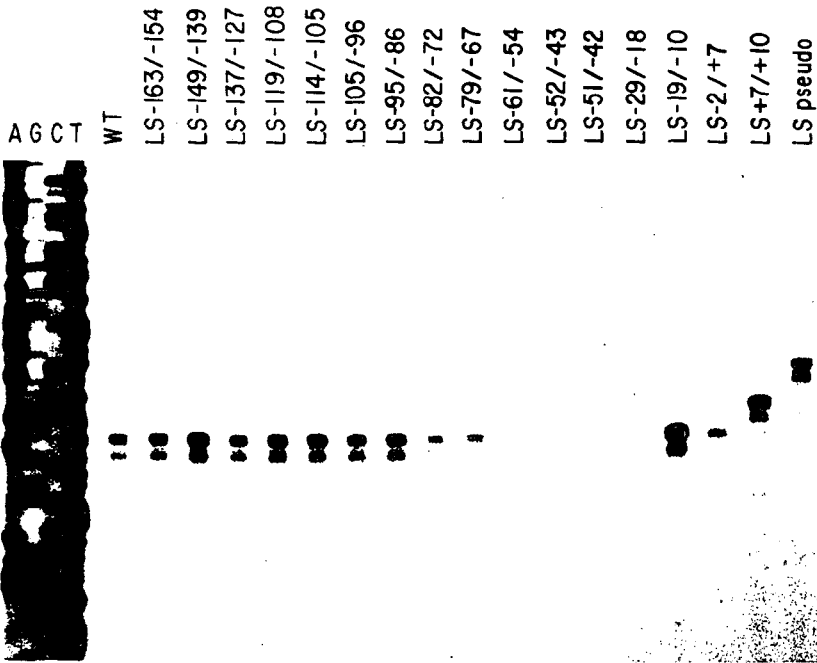
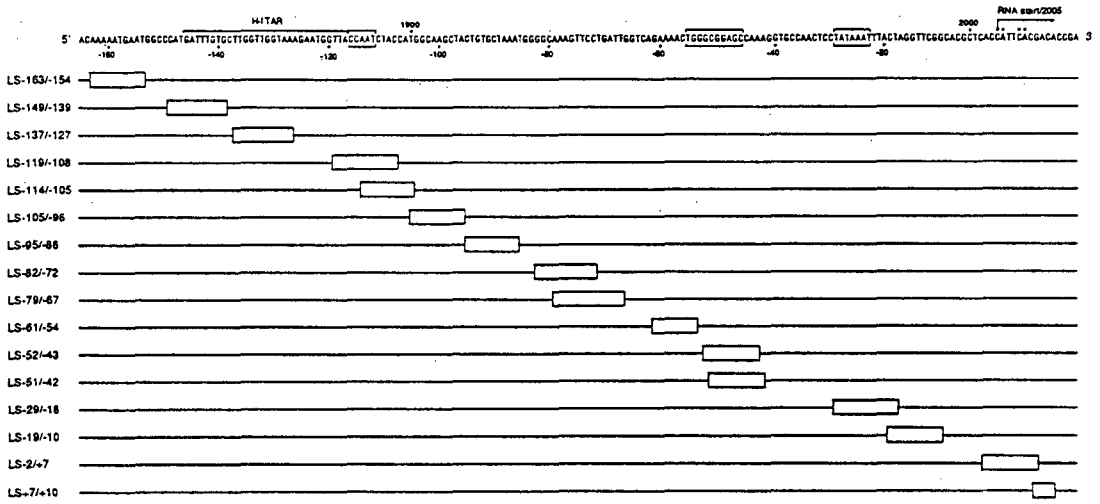


그림 7. P38 promoter의 linker scanning mutants 와 in vitro primer extension 분석

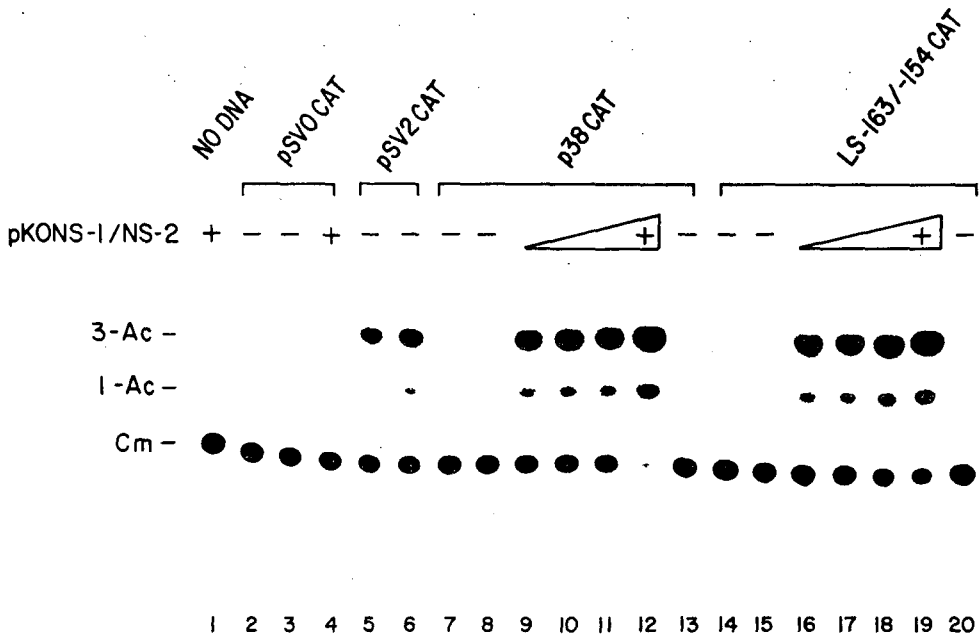


그림 8. 비구조 단백질에 의한 P38 promoter의 transactivation

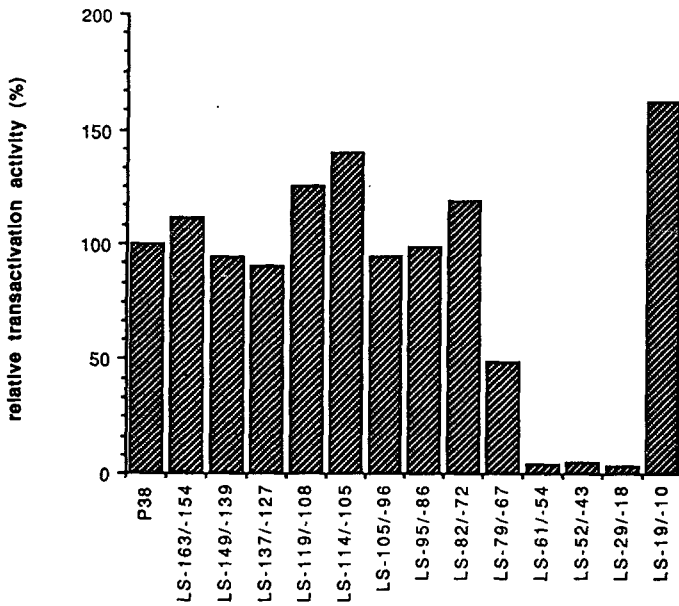


그림 9. P38 promoter LSCAT의 상대적 transactivation level