

인간 Papillomavirus의 E6,E7유전자를 이용한 Transgenic Mouse의 확립

¹경남대학교 공과대학 식품공학과, ²제일제당주식회사 종합연구소

황용일^{1*} · 이승철¹ · 김현수²

=Abstract=

Establishment of Transgenic Mouse with the E6 and E7 Genes of Human Papillomavirus Type 16

Yong-Il Hwang^{1*}, Seung-Cheol Lee¹ and Hyun-Su Kim²

¹Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan, Kyungnam,

²R&D Center of Cheil Foods & Chemicals, Co., Kyunggi-Do, Korea

Human papillomavirus (HPV), especially type 16 and 18, has been closely associated with carcinomas and uterine cervical cancer, recently. From *in vitro* assays, E6 and E7 genes of HPV16 are closely linked with transformation of cell lines of rodent fibroblasts. However, the transforming activity of E6 and E7 genes of HPV type 16 *in vivo* has not been fully elucidated. For explaining this mechanism, we prepared a expression system with the promoter of mouse mammary tumorvirus long terminal repeat and E6E7's open reading frames. This expression system was introduced in rodent cell lines, No. 7, 3Y1 and shown normal transforming abilities. And, we produced transgenic mice with E6, E7 expression system. These transgenic mice were confirmed from Southern blot analysis. One male of them was observed enlargement of the testis after 5 months postdelivery.

Key Words: Human papillomavirus, E6 and E7 genes, mouse mammary tumorvirus long terminal repeat, transgenic mice, E6, E7 expression system

서 론

인간에서 발생하는 암의 주 원인은 약 20%가 주로 virus의 감염에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다 [1]. 이들 virus중 human papillomavirus(HPV)는 Papovaviridae의 일종으로 약 8 Kb로 이루어진 DNA virus [1]이다. HPV는 인간에 감염시 주로 양성종양, 혹은 형성하거나 악성종양을 형성하는 것으로 약 80종 이상이 현재 알려져 있다. 이 중에서 악성종양으로 알려진 남성의

생식기 암이나 여성의 자궁경부암, 피부암등의 주원인은 HPV중에서 16형과 18형이 관련이 깊다 [2]. 이들 16형, 18형 virus의 genome 해석 결과, 여러 유전자중에서 특히 E6, E7유전자가 발암의 증상이라고 할 수 있는 tumorigenicity, REF 및 HEF의 immortalization, soft agar에서의 colony 형성, saturation density등과 직접적인 관련이 있으며 [3,4,5] 각각 암억제유전자로 널리 알려진 p53 및 RB 단백질과 세포내에서 작용하여 세포의 증식억제등을 해제시키는 기능 또한 지니고 있다 [6].

최근, 여러영역에서 다수의 유전자가 분리되어 이들 유전자의 생체내에서의 기능검정을 위

* Corresponding author

하여 직접 해석이 가능한 transgenic mouse계가 이용가능하기 시작하였다. 숙주영역이 극히 한정되어 있는 papillomavirus의 경우도 역시 이러한 실험계가 유효하여 1986년 Lacey등 [7]에 의하여 bovine papillomavirus의 일부영역을 이용한 transgenic mouse계가 확립된 이래, 다수의 연구팀에 의하여 papillomavirus 관련 transgenic mouse계의 확립에 관한 연구가 진행되고 있다. 본 연구는 fibroblast나 epidermal keratinocyte를 이용하여 이미 밝혀진 HPV의 영역별 기능해석의 결과를 토대로 하여 발암증세와 직접적인 관련이 있는 E6, E7 유전자의 in vivo에서의 carcinogenesis의 기구를 해석하고 나아가 제암효과를 지닌 물질의 기능검정이 가능한 HPV16 E6, E7 transgenic mouse계를 확립하고자 하였다.

본 연구는, 이미 밝혀진 E6E7 ORF에 비교적 광범위한 조직세포에서 발현하는 것으로 알려진 mouse mammary tumor virus (MMTV) [8] long terminal repeat (LTR)의 promoter를 연결하여 expression계를 작성하였다. 만들어진 expression계의 검정을 위하여 각종 cell line에 transfection하여 조사한 바 정상적인 expression을 확인하였다. 이들 E6E7 expression계를 포함하는 DNA단편을 C57BL/6J mouse에 도입하여 transgenic mouse를 구축하였다. transgenic mouse의 형태적인 변화로는 testis의 종양화(거대화)를 관찰할 수 있었다.

재료 및 방법

1. 배지 및 시약

동물세포 배양 및 처리를 위한 fetal bovine serum, DMEM, trypsin, EDTA 등은 Gibco BRL사로 부터, DNA분자의 조제용 *E. coli*의 배양을 위한 LB배지의 tryptone, yeast extract등은 Difco사에서 구입하였다. 사용된 DNA제한효소와 수식효소, ligase는 Boehringer Mannheim, Promega, Poscochem, Takara에서 구입하였으며, agarose gel에서의 DNA단편의 분리정제는 Takara사의 suprecTM01을 사용하였다. 실험용 원심tube등의 일회용기구는 Falcon, Nunc, Corning사에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 각종 시약들은 주로 Sigma에서 구입하였으며, 이외의 시약들은 주로 특급 제품을 사용하였다.

2. 균주 및 배양세포

DNA등의 검정 및 정제를 위하여 대장균 DH10B를 사용하였으며, 배양세포로, primary cell로는 REF를, cell line은 NIH3T3, F2408유래의 No. 7, 3Y1을 사용하였다.

사용된 mouse로는 C57BL/6J, BALB/c (nue)를 이용하였다. 실험 진행상 임의로 다른 cell line, mouse도 혼용하였다.

3. 실험방법

일반적인 DNA method는 Maniatis등의 방법 [9]에 따라 하였으며, mouse의 tail에서의 chromosomal DNA의 추출은 55℃, 10% SDS 처리 후 phenol 처리하여 정제하여 TE buffer에 녹여 적당량 사용하였다.

E6E7 유전자의 검정을 위한 southern blot analysis [10]는 제한효소 처리 후 1% agarose상에서 전기영동 후 MSI사의 nylon membrane에 옮겨 이후의 조작은 Maniatis등의 방법 [9]에 따랐다.

DNA단편을 이용한 동물세포의 transfection은 calcium-phosphate buffer내에서 Graham과 van der Eb의 방법 [11]에 따라 하였다.

그 이외의 일반적인 세포생물학적인 실험방법은 New Cell Biology experiment protocol [12]를 참조하여 실시하였다.

Transgenic mouse의 제작은 분리 정제 처리된 HPV 16형의 E6, E7유전자의 expression계를 포함하는 DNA단편을 C57BL/6J mouse의 cross에 의하여 얻어진 수정 embryo에 microinjection하여 C57BL/6J의 자궁내에 도입하여 태어나는 새끼 mouse에서 확인하였으며 Hogan등의 방법 [13]과 Nomura와 Katsuki의 보고 [14]를 참고로 하였다.

이외의 일반적인 실험방법은 주로 Maniatis등의 방법 [9]을 변용하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. HPV 16 E6,E7 유전자 expression계의 확보

HPV 16의 viral genome 전 영역에 걸친 기능해석의 결과, 여러 유전자 중에서 특히 E6 과 E7은 primary cell의 immortalization의 원인이 되며, cell line에서의 expression에 의하여 다양한 carcinogenesis를 유발한다. HPV에 의한 carcinogenesis를 규명하기 위한 전단계로 타당한 transgenic mouse의 확립은

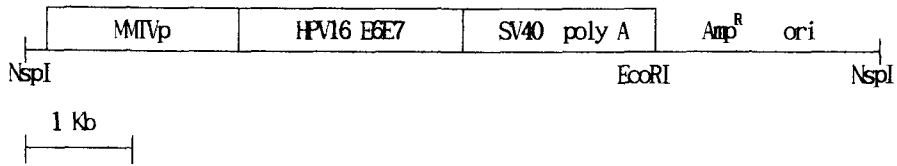


Fig. 1. Structure of E6E7 expression plasmid. MMTVp and SV40 poly A are promoter region of MMTV and the site for polyadenylation for SV40 early mRNA, respectively. HPV16 E6E7 is the region of E6E7 ORF's. The other regions with Amp^R and ori are derived from Pvu II -EcoR I of pBR322.

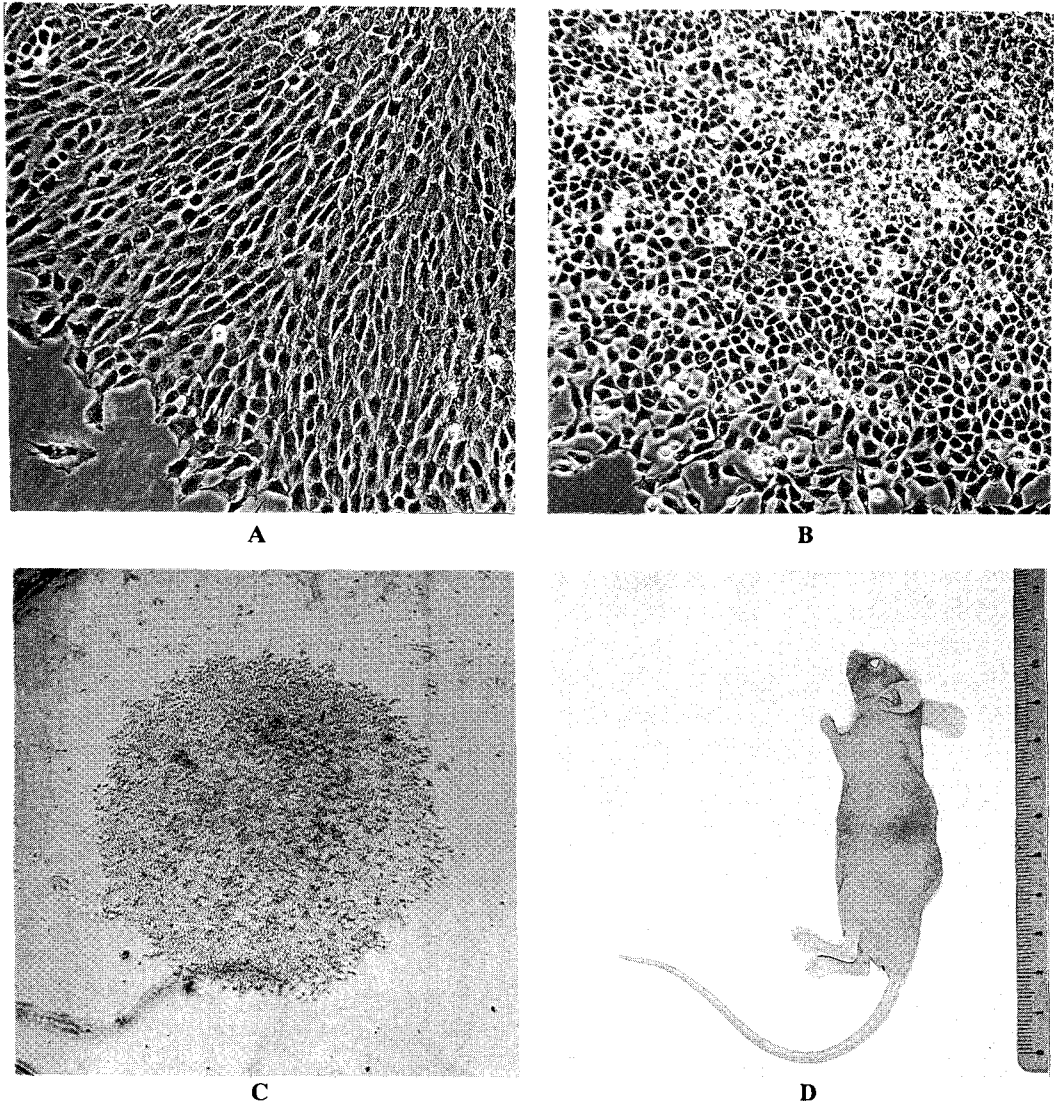


Fig. 2. Tumorigenesis by E6E7 expression in No. 7 cells. **A.** Nontransfected No. 7 cells, **B.** Transfected No. 7 cells with E6E7 expression vector, **C.** Focused cells of B, **D.** Tumor induced in BALB/c mouse with B's cells.

E6,E7 유전자의 도입에 두고 E6,E7유전자군의 발현계를 구축하기로 하였다. 비교적 광범위한

조직에서의 발현을 위하여 MMTV의 LTR의 promoter하에 E6E7을 연결하여 fusion gene을 작성

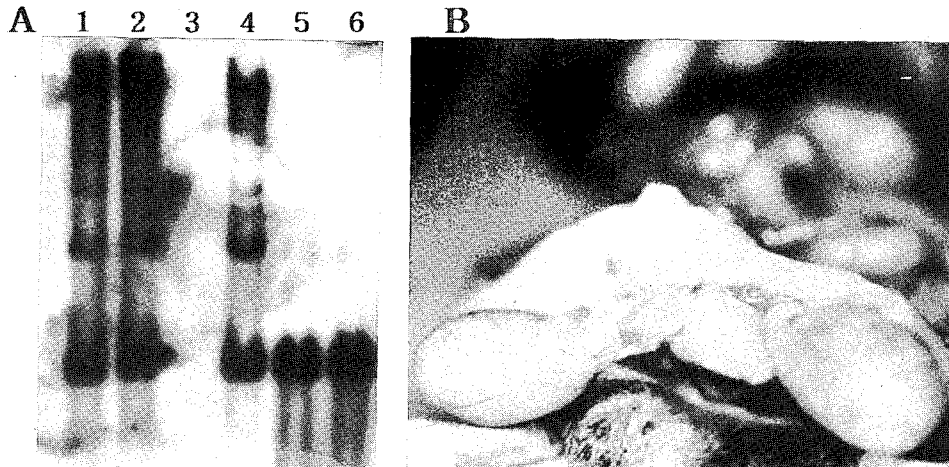


Fig. 3. Southern blot analysis and Testicular enlargement. A. No. 1, 2, 4, 5 and 6 are *NspI-EcoRI* digested genomic DNA of HPV16 E6E7 transgenic mice and No. 3 is a control C57BL/6J mouse, B. Massive enlargement of both testes in HPV16 E6E7 transgenic mouse.

하였다 (Fig. 1). 이로써 E6E7 ORF's는 MMTV의 LTR 및 HPV16 early promoter에 의하여 효율적인 발현이 예상된다. 여기에서 작성된 E6E7 expression vector를 이용하여 검정을 거쳐 향후의 transgenic mouse의 작성에 사용하였다.

2. Cell line에서의 E6E7의 expression의 확인

상기 제작된 E6E7 expression vector의 *in vivo*에서의 정상적인 거동을 먼저 검정하였다. 이미 알려진 바로 primary cell에서의 E6,E7 유전자 산물은 단지 immortalization에만 영향을 미치나 [15] cell line에서의 발현은 p53 및 Rb단백질에 작용을 하여 다양한 phenotype의 carcinogenesis를 유발한다 [6]. 설치류의 cell line, NIH3T3, F2408 아래의 No. 7, 3Y1등에 calcium법에 따라 E6E7 expression vector를 도입하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 E6E7에 의하여 transfection된 B의 세포는 A와 비교시 뚜렷한 차이를 보였으며 혈청배지상에서 C에서와 같이 focus를 형성하였다. 별도의 실험에서 soft agar에서 배양한 결과 뚜렷한 colony forming능을 보였다. 나아가, 이러한 transform된 cell을 BALB/c nude mouse에 주사한 결과, Fig. 2의 D에서와 같이 3주이후부터 육안으로 식별가능한 tumor를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. 이로써 상기항에서 제작된 E6E7 expression vector는 *in vivo*에서 정상적으로 발현됨을 확인하였다.

3. HPV16 E6E7 transgenic mouse의 확립

상기 실험의 결과로부터 cell에서의 정상적인 발현이 확인된 E6E7 expression vector를 이용하여 transgenic mouse의 제작을 시도하였다. 먼저 채란이나 향후 실험등의 편의성을 고려하여 여러 mouse중에서 비교적 transgenic mouse의 확립이 편리한 129계, C57BL/6J, ICR계통의 mouse중에서 C57BL/6J를 우선 이용하기로 하였다. 효율적인 embryo에의 도입을 위하여 Fig. 1에서의 *NspI*에서 *EcoRI*까지의 MMTV LTR 및 HPV16 E6,E7 유전자만을 지니는 DNA단편을 분리하였다. 분리된 DNA단편을 처리하여 C57BL/6J의 cross에서 얻어진 embryo에 microinjector로 주입하였다. 처리된 embryo는 가임상태의 C57BL/6J의 체내에 도입되어 최종적으로 transgenic mouse를 제조하였다. 일정기간 경과후 태어난 새끼 mouse중에서 E6E7 유전자의 보유여부를 검정하였다. Fig. 3의 A에서 보는 바와같이 embryonic transgenic founder들 [1,2,4,5,6]의 체세포에서는 probe E6E7단편을 이용한 Southern blot analysis의 결과로부터 tandem arrange된 transgene의 존재를 확인할 수 있었으며, densitometer의 결과로부터 5 copy이상이 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 Fig. 3의 A, 3에서는 동일계의 control mouse에서는 유사-signal이 확인되지 않았다. 이로써 염색체상의 E6,E7 유전자의 존재여부를 확인할 수 있었다. 한편, transgenic mouse중에서 웅성의 mouse들에게서

여러증상 중에서 특히 생후 5개월 이후부터 testis의 거대화(종양화)가 촉진될 만큼 정상 mouse와 비교시 현저함을 알 수 있었다 (Fig. 3의 B).

이후의 transgenic mouse상에서의 증상은 경시적인 관찰 및 병리조직적인 검사가 요구되며 현재 이러한 변화를 관찰 중에 있다.

결 론

인간에 HPV가 감염되어 일어나는 증세는 양성종양과 악성종양을 일으키며 이 중에서 악성종양은 HPV 16형과 18형에 의하여 여성의 자궁경부암, 남성의 생식기암, 피부암이 주종을 이룬다. 특히 악성종양 유발에는 E6,E7 유전자가 직접적인 병인인 증거가 많이 축적되어 있다. 이들 HPV16 E6,E7 유전자의 생체에서의 carcinogenesis의 기구해석을 위한 transgenic mouse를 확립함은 본 연구의 목표로 이하의 실험결과를 얻었다.

1. 악성종양 형성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려진 HPV16 E6,E7 유전자의 생체내에서의 효율적인 expression을 위하여 vector를 작성하였다. E6E7 발현용 promoter는 세포층에 악영향을 주지않고 광범위한 조직에서 발현을 보이는 MMTV LTR을 promoter로, 하류에는 SV40 polyA signal을 연결하여 효율적인 expression을 기대할 수 있었다.

2. HPV16 E6E7 expression vector를 이용하여 cell line, NIH3T3, No. 7, 3Y1등을 transfection에 의하여 이들 세포들은 효과적으로 transform되는 것을 관찰할 수 있었다. 대표적인 phenotype의 변화로는 5% FBS 함유 DMEM에서 세포의 외형적인 형태가 바뀌었으며 focus를 형성하고, soft agar에서 이들 세포는 colony를 형성하였다. 한편 이들 세포들을 nude mouse에 inject한 결과 3주 이후부터 육안으로 식별 가능한 tumor를 형성하였다.

3. Expression이 확인된 HPV16 E6,E7 expression vector 중에서 E6,E7 유전자의 expression에 관여하는 DNA단편 만을 순수하게 조제하였다. 조제 처리된 DNA단편을 mouse, C57BL/6J의 embryo에 microinjection시켜 일정기간 후 태어난 새끼들은 southern blot analysis의 결과 HPV16 E6,E7의 유전자를 보유하고있는 것으로 판명되었다.

이들 transgenic mouse중에서 음성 mouse는 특

이적으로 testis에서의 거대화(종양화)가 촉진 및 경시적인 육안 관찰로 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Zur Hansen H, de Villiers EM: Human papilloma virus. Annu Rev Microbiol 48: 427-447, 1994.
2. Zur Hansen, H: Papillomavirus as carcinoma virus. Adv Virol Oncol 8: 1-26, 1989.
3. Yutsudo M, Okamoto Y, Hakura A: Functional dissociation of transforming genes of human papillomavirus type 16. Virology 166: 594-597, 1988.
4. Vousden K, Doninger HJ, Dipaolo JA, Lowy DR: The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. Oncogene Res 3: 167-175, 1988.
5. Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R: Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. Proc Natl Acad Sci USA 87: 463-467, 1990.
6. zur Hansen H: Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific HPV types. Curr Top Microbiol Immunol 86: 131-156, 1994.
7. Lacy M, Alpert S, Hanahan D: Bovine Papillomavirus Genome Elicits Skin Tumor in Transgenic Mice. Nature 322:609-612, 1986.
8. Stewart TA, Hollingshead PG, Pitts SL: Multiple regulatory domains in the mammary tumor virus long terminal repeat revealed by analysis of fusion genes in transgenic mice. Mol Cell Biol 8: 473-479, 1988.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis, M: Molecular cloning: A Laboratory Manual. Vol. 1, 2, 3 Cold Spring Harbor, New York, 1989.
10. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517, 1975.
11. Graham FL, van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467, 1973.
12. Dep. of Oncology, The Institute of Medical

- Science, Univ. of Tokyo: New Cell Biology Experiment Protocol. Shujunsha Co., Ltd., Tokyo, 1993.
13. Nomura T, Katsuki M: Manual of developmental technology: how to make transgenic mouse. Kohdansha Scientific, Tokyo, 1987.
 14. Hogan B, Costantini F, Lacy L: Manipulating the Mouse Embryo-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986.
 15. Miyasaka M, Takami Y, Inoue H, Hakura A: Rat primary embryo fibroblast cells suppress transformation by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 in somatic hybrid cells. J Virol 65: 479-482, 1991.
-