

진핵세포에서 HIV-1 Envelope 변이 단백질의 발현 및 발현 단백질의 특성 연구

한림대학교 자연과학대학 유전공학과

류 지 윤 · 박 진 서*

=Abstract=

Expression and Characterization of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutant Envelope Glycoproteins in Mammalian Cells

Jiyoon Ryu and Jinseu Park*

Department of Genetic Engineering, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein is synthesized as a 160 KDa precursor, gp160, that is cleaved by a cellular protease to form the gp120 and gp41 subunits. Mammalian expression vectors were designed that are capable of efficient expression of various mutant envelope glycoproteins derived from a molecular clone of HIV-1. To construct these vectors, one type of mutation was made at the gp120-gp41 cleavage site by oligonucleotide-directed mutagenesis. And another mutation was made to change amino acids in the membrane spanning region of HIV-1 gp41 important for membrane anchorage. Next, these two mutations were combined to generate a vector to have double mutations in cleavage site and membrane-spanning region. These mutants were transiently expressed in mammalian cells. The effect of these mutations on envelope glycoprotein synthesis, proteolytic processing and secretion was determined. In addition, cell surface expression and ability of the glycoprotein to induce syncytium formation were examined. This study provides a mammalian expression system that is capable of efficient expression and secretion of soluble gp160.

Key Words: HIV, Envelope glycoprotein, Expression, Proteolytic processing, Secretion

서 론

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)을 일으키는 Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) 유전자 (genome)는 약 9.5 Kilobase (kb)로 모든 retrovirus에 공통으로 존재하는 3가지 주요 유전자인 *gag*, *pol*과 *env*를 갖고 있고 바이러스의

복제에 필요한 구조 단백질과 기능 단백질을 합성한다. 이외에도 바이러스 유전자의 복제를 조절하는 조절 유전자를 갖고 있다 [3,24].

유전자 발현과정에서 HIV-1의 Envelope 당단백질은 처음에 singly spliced mRNA로부터 membrane bound ribosome에서 88 KDa의 전구체로써 합성된다 [1]. 전구체는 소수성 N-terminal signal sequence (20~30 amino acids)를 갖고 있어 세포의 secretory

접수 : 1999년 9월 6일

*책임저자: 박진서, 강원도 춘천시 옥천동 1번지, 한림대학교 유전공학과. Tel: 0361-240-1468, Fax: 0361-256-3420, E-mail: jinpark@sun.hallym.ac.kr

pathway를 통하여 이동한다. 이 부위는 rough endoplasmic reticulum (RER)으로 이동되는 동안 분해된다. 그 후 ER에서 전구체는 glycosylation과 올바른 3차 구조로의 folding을 겪게 된다. 이때 전구체는 160 KDa의 분자량을 갖게 된다 [13]. 다른 retrovirus와 공통으로 HIV-1 envelope 당단백질은 folding 후 세포내 이동과 안정성에 중요한 oligomer 구조를 형성하게 된다 [5,30]. 전구체는 세포내 protease에 의해 Golgi에서 분해되어 120 KDa의 외피 당단백질 (surface glycoprotein; SU)과 41 KDa의 막투과 당단백질 (transmembrane glycoprotein; TM)을 생산하게 된다. 이 단백질들은 세포막으로 이동되어 바이러스 조립과정 중 바이러스 입자로 삼입된다 [13,30]. 이러한 단백질 분해과정은 바이러스의 감염력과 syncytia 형성에 필수적이다 [18]. 생합성된 gp160 중 일부 (5~15%)만 분해되어 gp120와 gp41을 생산하고 분해되지 않은 대부분의 gp160는 lysosome으로 이동되어 분해되게 된다 [30]. Gp160가 분해된 후 high-mannose sugar side chains의 일부가 complex sugars로 변환되어 성숙된 SU 단백질은 complex와 high-mannose 당 잔기를 갖는다 [1,17]. TM 단백질은 complex 당 잔기 사슬을 갖게 된다 [1]. 이와 같이 생성된 외피 당단백질인 gp120와 막투과 당단백질인 gp41은 바이러스 입자나 세포막에서 비공유결합에 의해 연결되어 있다. HIV-1의 Envelope 당단백질은 감염시 바이러스가 세포내에 들어오는 과정, syncytium 형성, 세포에서 세포로의 전염과정과 단세포를 죽이는 과정에 관련된다 [3,14].

HIV-1는 구조 유전자와 여러가지 조절 유전자를 갖고 있으므로 감염세포에서 생산되는 바이러스 입자를 이용하여 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 바이러스 성분을 선택적으로 확보하기가 매우 어렵다. gp120 당단백질은 막투과 단백질인 gp41과 비공유결합에 의해 바이러스 입자의 표면에 존재한다. 그러므로 gp120 당단백질을 바이러스 배양액으로부터 정제시 shedding이라는 현상에 의하여 바이러스 입자로부터 쉽게 손실된다. 게다가 막투과 단백질인 gp41은 소수성 특징 때문에 정제과정 중 바이러스 입자로부터 용이하게 회수하기가 어렵다. 특히 분해되지 않은 gp160 당단백질 전구체는 일반적으로 세포배양액으로 분비되지 않는다. 이러한 특징으로 인하여 이들 당단백질에 대한 연구에 많은 어려움이 있었다. 따라서 본 연구의 목적은 HIV-1 Envelope 당단백질의 생물학적,

구조적 특성을 효율적으로 연구하기 위하여 분리하기 용이한 수용성 HIV-1 gp160 당단백질을 진핵세포에서 발현시키고 생산할 수 있는 체계를 확립하여 발현된 수용성 당단백질의 특성을 분석하는 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 HIV-1 바이러스의 구성 성분 중 유전자 조작을 이용하여 선택적으로 여러가지 유형의 HIV-1 Envelope 당단백질을 진핵세포에서 발현시킬 수 있는 발현체계를 확립하고 여러가지 Envelope 당단백질의 변이종을 진핵세포에서 발현시켜 발현된 당단백질의 합성, 분해, 분비 유무 및 기능적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. Site-directed mutagenesis

HIV-1 Envelope 유전자에 원하는 변이를 도입하기 위하여 감염력이 있는 proviral clone인 HXB2의 *KpnI-BamHI env* 절편을 pBluescript KSII(-) plasmid로 삼입시켜 제조된 벡터를 pIKS-AB라고 명명하였다 [24]. pIKS-AB plasmid를 CJ236 *E. coli* strain (*dut⁻, ung⁻* and *Cm^r*)에 transformation 시켜 0.25 µg/ml uridine이 첨가된 LB-amp chloramphenicol 배지에서 배양하였다. OD₆₀₀가 0.5~0.6 정도 되었을 때 M13KO7 helper phage를 superinfection 시켜 (10 m.o.i./bacterium) LB-amp chloramphenicol, kanamycin, thymidine 및 uridine 배지에서 8시간 배양하여 uracil-enriched single strand (ss)-phagemid를 얻었다. Phagemid를 PEG/NaCl (20% PEG and 2.5 M NaCl)로 침전시켜 ss-DNA를 추출하고 1 µg의 ss-DNA와 5pmole의 mutagenic primer (5'-GGTGCAGAGCGA-AAAA AGCGCAGTGGG-3'; for cleavage site mutation, 508 A/S, 511 A/S 혹은 5'-AAATTATTCA-TAGTGGCCATGGGAGGCTTGGTA-3'; for transmembrane domain mutation, 687~689 MIV/VAM)를 섞어 10 µl annealing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM MgCl₂ and 50 mM NaCl)에서 annealing 시킨 다음 여기에 1 µl의 10X synthesis buffer (5 mM dNTP, 10 mM γATP, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM MgCl₂ and 20 mM DTT)와 3 unit T4 DNA ligase 및 1 unit T4 DNA polymerase를 첨가하여 얼음에서 5분, 25℃에서 5분, 최종 37℃에서 90분간 반응시켰다. 이 DNA를 *E. coli* MV1190 (*dut⁺, ung⁺*) strain에 transformation 시킨 다음 원하는 transformant를 Sanger dideoxy termination 방법으로 확인하였다 [24]. Cleavage site에 변이가 도입

된 pIIKS-AB 벡터를 pIIKS-AB508/511이라고 명명하였다. Transmembrane domain에 변이가 도입된 pIIKS-AB 벡터를 pIIKS-AB687/689이라고 명명하였다.

2. Env 유전자 발현 벡터 제조

Wild type env 유전자 발현 벡터인 pLTRENV를 이용하여 변이 Envelope 당단백질 발현 벡터를 다음과 같이 제조하였다 [23]. 본 연구에서는 이 벡터를 pENVw.t이라 명명하였다. Site-directed mutagenesis에 의해 cleavage site에 변이가 도입된 pIIKS-AB508/511로부터 *KpnI*-*Bam*HI 절편을 분리하여 *KpnI*-*Bam*HI 절편이 제거된 pENVw.t 벡터로 삽입하였다. 제조된 벡터를 pENVc라고 명명하였다. 그리고 transmembrane domain에 변이가 도입된 pIIKS-AB508/511로부터 *KpnI*-*Bam*HI 절편을 분리하여 *KpnI*-*Bam*HI 절편이 제거된 pENVw.t 벡터로 삽입하였다. 제조된 벡터를 pENVi이라고 명명하였다. 또한 cleavage site에 변이가 도입된 pIIKS-AB508/511과 transmembrane domain에 변이가 도입된 pIIKS-AB687/689을 이용하여 cleavage site와 transmembrane 영역에 이중 변이가 도입된 Envelope 당단백질 발현 벡터를 제조하였다. pIIKS-AB687/689의 *BsmI*-*Bam*HI 절편을 pIIKS-AB508/511의 *BsmI*-*Bam*HI 절편과 대체시켰다. Cleavage site와 transmembrane 영역에 이중 변이를 갖는 벡터를 pIIKS-ABc/t라고 명명하였다. pIIKS-ABc/t의 *KpnI*-*Bam*HI 절편을 pENVw.t의 *KpnI*-*Bam*HI 절편과 대체시켜 제조된 벡터를 pENVc/t라고 명명하였다.

3. Transfection procedures

HIV-1 바이러스 단백질을 발현하는 DNA를 DEAE-dextran method를 이용하여 원숭이 신장세포인 COS-1 세포로 transfection 시켰다. 100 mm 조직 배양 dish에 2×10^6 cells을 이용하여 배양배지 ml 당 5 μ g DNA와 500 μ g DEAE-dextran (분자량, 500,000 Da)을 이용하여 DNA를 transfection 시켰다. DNA-DEAE-dextran 혼합물로 세포를 3시간 동안 배양 후 세포를 chloroquine (20 μ g/ml)을 함유하는 완전배지에서 2시간 동안 배양하였다. 그리고 세포를 2분간 10% dimethyl sulfoxide에서 충격을 준 후 DMEM으로 세척하고 완전배지를 첨가하여 48시간 동안 37°C에서 배양하였다 [23,24].

4. 면역침전법

세포를 DMEM으로 세척하고 methionine이 결핍된 DMEM에서 1시간 동안 예비 배양하였다. 1시간 후 [³⁵S]methionine (50 μ Ci/ml)이 보강된 배지에서 일정 시간 동안 배양하였다. 방사선 동위원소를 이용하여 세포를 표시 시킨 후 배양액과 세포를 회수하여 다음과 같이 immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl [pH 7.34])로 배양시켜 용해되도록 하였다. 원심분리를 통해 고분자량의 DNA와 세포잔재를 제거한 후 HIV-1 단백질에 대한 항체를 첨가하고 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. Protein A-Sepharose를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 immunoprecipitates를 회수한 후 RIPA buffer로 3번 세척하였다. Immunoprecipitates를 beads로부터 방출시키기 위해 beads를 gel sample loading buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol과 0.1% bromophenol blue)에서 5분간 끓인 후 원심분리를 통해 beads를 상등액과 분리시켰다. 상등액에 존재하는 면역침전된 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석하여 autoradiogram을 통해 단백질의 유형을 살펴보았다 [23,24].

5. 면역형광법

24 well에 각각 0.5 ml의 complete DMEM을 넣고 멸균된 cover glass를 각각 well에 넣었다. 2×10^5 /0.5 ml의 COS-1 세포를 37°C 7.0 % CO₂ 배양기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 다음날 transfection을 하고 난 후 48시간 동안 37°C 7.0% CO₂ 배양기에서 배양했다. 48시간 후 배지를 제거하고, PBS로 2번 씻어 주었다. 각 well에 3.7% formaldehyde를 0.5 ml씩 넣어주고 10분간 세포를 고정시켰다. Formaldehyde를 aspiration하고, 차가운 methanol을 넣어 주어 15초간 처리하였다. Methanol을 제거하고 PBS를 넣고 5분간 배양하였다. 다시 aspiration 후 PBS를 넣고 5분간 배양하였다. PBS를 제거하고 나서 10배 희석된 AIDS 환자 혈청 30 μ l를 cover glass 위에 떨어뜨려 주고 1시간 상온에서 배양하였다. 1시간 후 PBS로 2번 반복하여 씻어주고 goat anti-human IgG-FITC (SIGMA Chemical Co., USA)를 PBS에 1/100으로 희석하여 60 μ l씩 cover glass 위에 떨어뜨려 준 후 1시간 배양하였다. 1시간이 지

난 후 goat anti-human IgG-FITC를 제거하고 PBS로 3번 씻어 주었다. slide glass 위에 mounting solution을 첨가하고 cover glass를 덮어 건조시키고 형광현미경으로 확인하였다 [30].

6. 다핵세포 (Syncytia)의 형성

여러가지 유형의 envelope 당단백질을 발현시키는 벡터로 transfection된 COS-1 세포를 9 ml의 PBS로 1번 씻어준 후, 50 mM EDTA (pH 7.5)가 녹아있는 PBS 10 ml을 넣어주고 37°C에서 40~50분간 배양하였다. pipet으로 COS-1 세포를 회수하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포만 모았다. 이것을 5 ml PBS로 1번 씻어주고, 2 ml의 완전배지에 녹여 6 well plate에 넣었다. 여기에 CD4⁺ Jurkat 세포를 1x10⁷으로 넣고 1 ml의 RPMI 완전배지를 첨가한 후 이것을 37°C 7.0% CO₂ 배양기에서 하룻밤 동안 배양하여 다핵세포 형성을 도립현미경 하에서 관찰하였다 [6].

결 과

1. 진핵세포에서 여러가지 유형의 HIV-1 Envelope 당단백질을 발현시키는 expression vector 제조

HIV-1 Envelope 유전자를 진핵세포에 선택적으로 발현시키기 위하여 제조된 전형적인 진핵세포 발현 벡터인 pENVw.t [23]을 이용하여 gp120와 gp41 사이에 존재하는 분해자리를 제거함으로써 gp160의 전구체 상태로 발현되도록 변이를 도입하였다. Site-directed mutagenesis에 의해 cleavage site 주변에 있는 508번째 아미노산인 alanine을 serine, 511번째 아미노산인 alanine을 serine으로 변이시켰다. 이렇게 제조된 벡터를 pENVc라고 명명하였다 (Figure 1A). Site-directed mutagenesis를 이용하여 transmembrane domain에 변이를 도입함으로써 gp41 영역에 존재하는 막투과 영역의 기능을 상실하도록 유도하였다. gp41에 존재하는 transmembrane domain의 687에서 689번째 아미노산에 해당되는 methionine, isoleucine, valine을 valine, alanine, methionine으로 각각 변이시켰다. 이렇게 변이가 도입된 벡터를 pENVt이라고 명명하였다 (Figure 1B). Cleavage site에 변이가 도입된 벡터와 transmembrane domain에 변이가 도입된 벡터를 이용하여 cleavage site와 transmembrane 영역에 이중 변이가 도입된 Envelope 당단백질 발현 벡터를 제조

하였다. 이렇게 제조된 벡터를 pENVc/t라고 명명하였다 (Figure 1C).

2. 진핵세포에서 여러가지 유형의 HIV-1 Envelope 당단백질 발현 유무 조사

1) 세포내 단백질 분석

제조된 벡터로 transfection된 원숭이 신장세포인 COS-1 세포로부터 HIV-1 Envelope 당단백질의 발현을 면역침전법으로 조사하였다. AIDS 환자로부터 분리된 혈청을 이용하여 생성물을 분석하여 Envelope 당단백질의 발현 유무를 확인하고 항원적 특이성을 조사하였다. pENVw.t 벡터로부터 성숙된 gp120와 gp41 당단백질이 생성되는 것이 확인되었다 (Figure 2). 이러한 결과는 Envelope 당단백질이 gp160의 전구체로 합성된 후 proteolytic processing을 거쳐 성숙된 형태의 gp120와 gp41로 발현되었음을 나타낸다. pENVc 벡터로부터 발현된 단백질은 gp160의 전구체 상태로 세포내에 존재하는 것으로 확인되었다. 이 벡터로부터 발현된 Envelope 당단백질은 전구체인 gp160로 발현된 후 gp120와 gp41 사이에 존재하는 분해자리의 제거로 인해 세포내에 전구체의 형태로 그대로 남아 있다는 것을 나타낸다. pENVt 벡터로부터 발현된 단백질은 Envelope의 전구체인 gp160 보다 약간 작은 분자량을 가진 단백질로 발현되는 것으로 확인되었다. pENVc/t 벡터로부터 발현된 단백질은 pENVt 벡터로부터 발현된 단백질과 같은 분자량을 가진 단백질로 발현되는 것으로 확인되었다.

2) 세포배지에 존재하는 단백질의 분석

제조된 벡터로 transfection된 COS-1 세포의 배양액에 존재하는 HIV-1 Envelope 당단백질의 유무 및 유형을 AIDS 환자로부터 분리된 혈청을 이용한 면역침전법으로 조사하였다 (Figure 3). pENVw.t 벡터로 transfection된 COS-1 세포의 배양액에 성숙된 gp120 당단백질이 검출되었다. 이러한 결과는 gp120 당단백질이 막투과 단백질인 gp41과 비공유결합에 의해 세포의 표면에 존재하기 때문에 gp120 단백질이 shedding에 의해 세포배양액으로 유출되었음을 나타낸다. pENVc 벡터로 transfection된 COS-1 세포의 배양액에는 특별한 바이러스 단백질이 검출되지 않았다. 이러한 결과는 이 vector로부터 발현된 Envelope 당단백질은 전구체인 gp160로 발현된 후 gp120와 gp41 사이에 존재하는 분해자리의 제거로 인해 세포내에 전구체의 형태로 그대로 남아 세포배양액으로 유출되지 않는다는

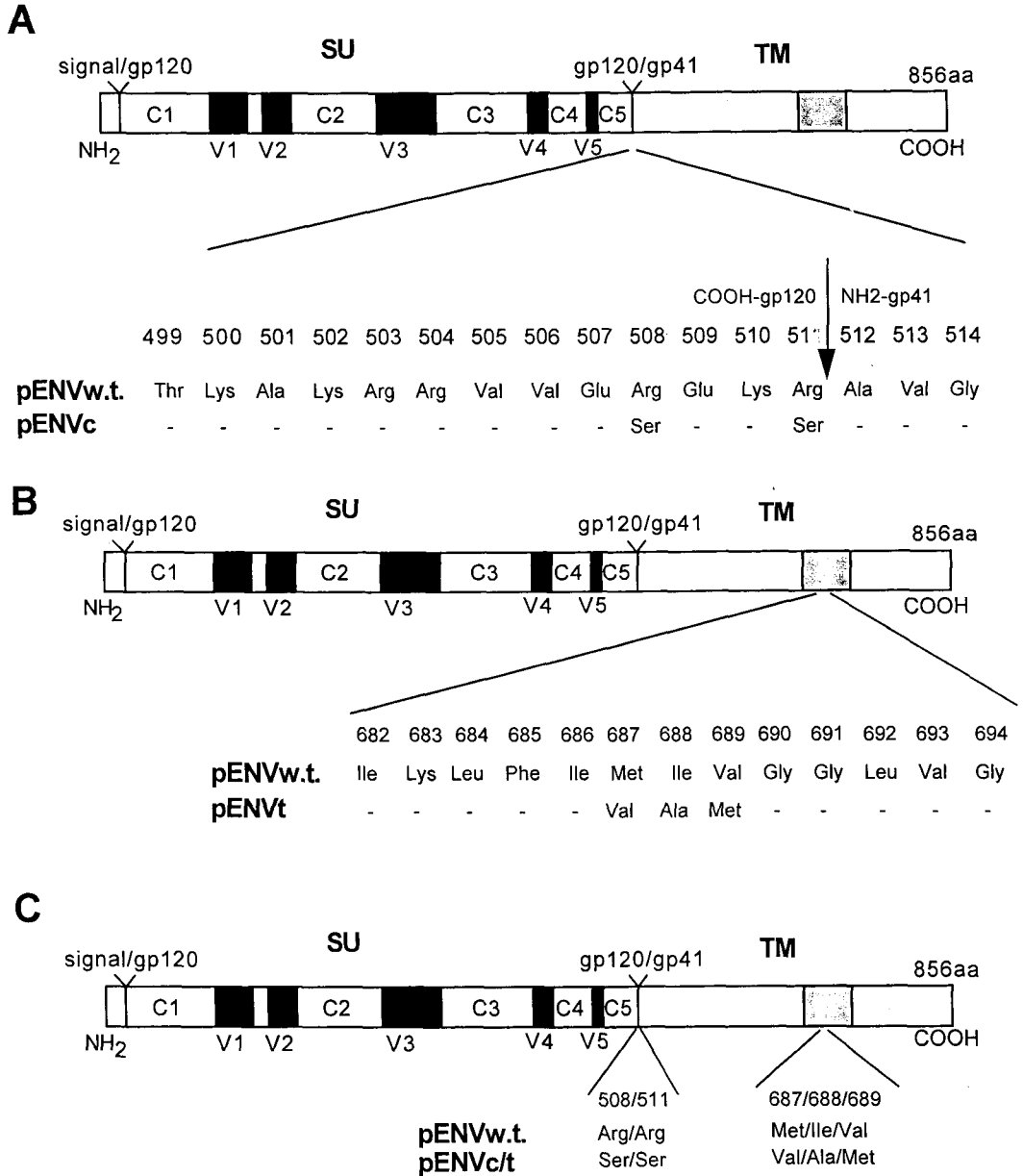


Figure 1. Construction of mutant envelope glycoprotein expressing plasmids. (A) One type of mutation was made in the DNA sequence coding for the amino acids at the gp120-gp41 cleavage site by oligonucleotide-directed mutagenesis. The resulting mutant was designated as pENVc. The arrow indicates the cleavage site of gp160. (B) The other type of mutation was made to change amino acids in the membrane-spanning region of HIV-1 gp41 important for membrane anchorage. The resulting mutant was designated as pENVt. (C) These two mutations were combined to generate a vector to have double mutations in cleavage site and membrane-spanning region. The resulting vector was named as pENVc/t. Five constant regions and five variable regions are indicated.

것을 나타낸다. pENVt 벡터로 transfection된 COS-1 세포의 배양액에는 성숙된 gp120와 전구체 형태

의 gp160 단백질이 검출되었다. 이러한 결과는 이 벡터로부터 발현된 단백질은 Envelope의 전구체인

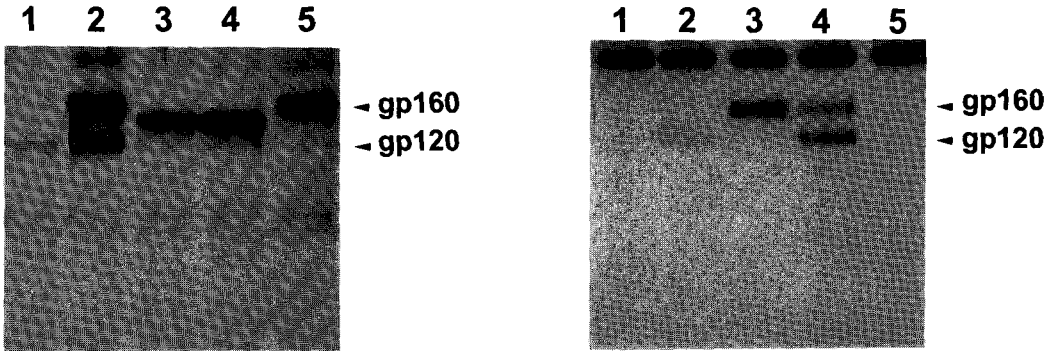


Figure 2. Analysis of HIV-1 envelope glycoproteins expressed in the COS-1 cells transfected with wild-type and mutant envelope-expressing plasmids. COS-1 cells were transfected with 10 µg of each plasmid by DEAE-dextran method. The transfected cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine (50 µCi/ml), and the cell extracts were immunoprecipitated with pooled sera from AIDS patients and analyzed by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent autoradiography. The relevant proteins are noted. Lane 1, control; lane 2, pENVw.t; lane 3, pENVt; lane 4, pENVc/t; lane 5, pENVc.

Figure 3. Analysis of HIV-1 envelope glycoproteins expressed from media of the COS-1 cells transfected with wild-type and mutant envelope-expressing plasmids. COS-1 cells were transfected with envelope-expressing plasmids. The transfected cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine (50 µCi/ml), and the culture media were clarified by a low-speed centrifugation followed by immunoprecipitation with pooled sera from AIDS patients to detect HIV-1-specific proteins and analyzed by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. The relevant proteins are noted. Lane 1, control; lane 2, pENVw.t; lane 3, pENVc/t; lane 4, pENVt; lane 5, pENVc.

gp160로 발현된 후 gp120와 gp41로 분해되었다는 것을 보여준다. 또한 두 당단백질이 transmembrane domain의 기능 손실로 인해 세포배양액으로 배출되었다는 것을 나타낸다. pENVc/t 벡터로 transfection된 COS-1 세포의 배양액에는 전구체 형태의 gp160 단백질이 검출되었다. 이 결과는 이 벡터로부터 발현된 단백질은 전구체 형태로 생산된 후 분해자리의 제거와 막투과 영역의 변이로 인하여 세포로부터 당단백질 전구체 형태로 세포배양액으로 분비되었다는 것을 나타낸다.

3. Transfection된 세포내에서 발현된 Envelope 당단백질의 면역형광법에 의한 분석

Transfection된 세포에서 발현된 Envelope 당단백질의 세포내에서의 분포를 확인하기 위해 면역형광법을 이용하여 분석하였다. 먼저 methanol을 이용하여 세포를 permeabilization 시키고 AIDS 환자의 혈청으로 처리하여 세포 표면에서 발현하고 있는 Envelope 당단백질 뿐만 아니라 세포내에 있는 Envelope 당단백질과 반응하도록 하였다. 여기에 FITC가 결합되어 있는 이차항체를 처리하여 세포수준에서 발현되고 있는 Envelope 당단백질의 정도와 분포를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다 (Figure 4). Mock transfection한 세포에서는 형

광이 나타나지 않았으며 wild type Envelope 당단백질을 발현하는 세포에서는 세포 전체에서 강한 형광을 나타내고 있는 것이 관찰되었다. 마찬가지로 gp160의 전구체를 발현하는 벡터로 transfection한 세포에서도 wild type Envelope 당단백질을 발현하는 세포에서와 같이 강한 형광을 보이는 것으로 나타났다. 수용성의 gp160 전구체를 발현하는 벡터로 transfection한 세포에서도 어느 정도 강한 형광이 관찰되었다. 이미 만들어진 Envelope 당단백질은 배양액으로 분비되지만 여기에서 발견되는 형광은 만들어지고 있는 Envelope 당단백질에 항체가 붙어서 나타난 것으로 볼 수 있다. 면역형광법을 이용한 실험결과는 여러가지 유형의 Envelope 당단백질을 발현하는 벡터로 transfection한 세포내에서의 Envelope 당단백질의 발현수준과 분포에 대한 정보를 제공한다.

4. 다핵세포 (Syncytia)의 형성 실험

HIV-1 바이러스에 감염된 세포나 바이러스 입자에 존재하는 HIV-1 Envelope 당단백질은 감염되지 않은 세포의 CD4 분자와 결합하여 세포막간의 융합을 유도하여 다핵세포를 형성할 수 있는 능력이 있다. 동물세포에서 발현된 여러가지 유형의

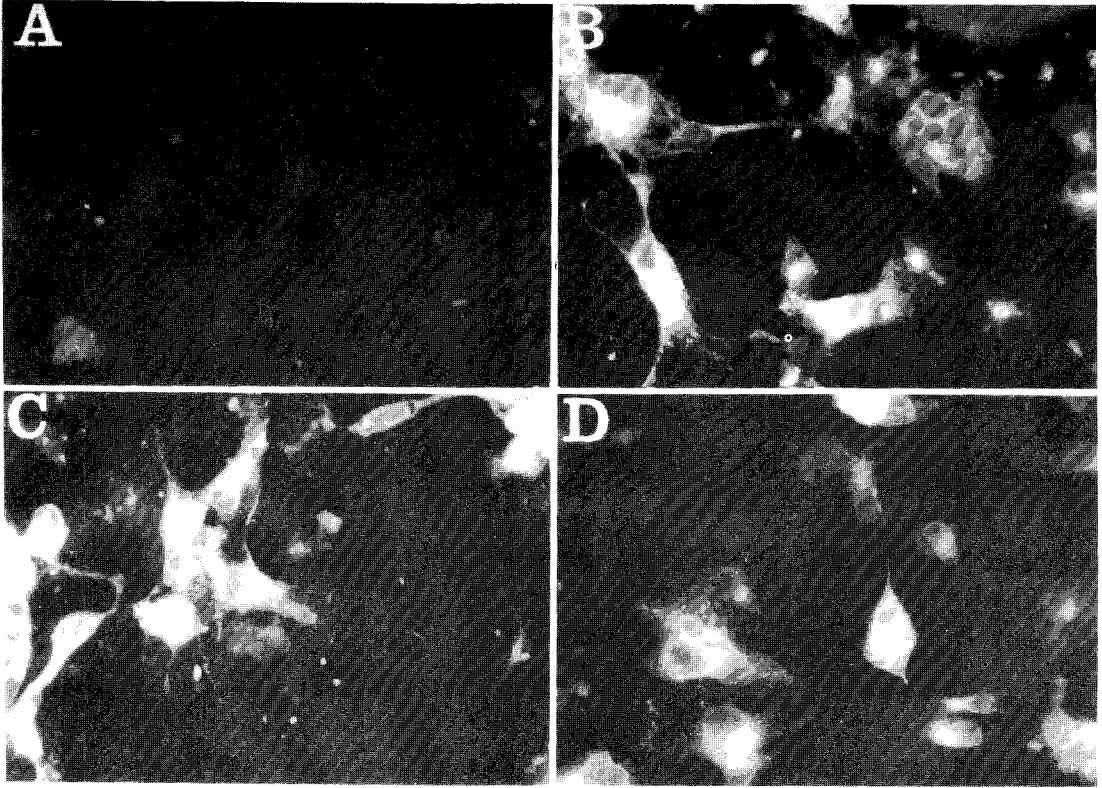


Figure 4. Immunofluorescence of COS-1 cells expressing HIV-1 envelope glycoproteins. Intracellular localization of HIV envelope glycoproteins by immunofluorescence in COS-1 cells transfected with envelope-expressing plasmids. At 48 h after transfection, the cells were fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence with pooled sera from AIDS patients. (A) mock-transfected cells; (B) pENVw.t; (C) pENVc; (D) pENVc/t.

Envelope 당단백질이 바이러스의 envelope와 같이 세포막 융합을 유도할 수 있는지를 알아보기 위하여 syncytia 형성 실험을 수행하였다. 여러가지 유형의 HIV-1 Envelope 당단백질을 발현하도록 transfection한 COS-1 세포를 CD4⁺인 Jurkat 세포와 함께 하룻밤을 배양시켰다. 세포막을 융합시킬 수 있는 능력을 syncytia의 형성 유무로 측정하였다. Mock transfection된 COS-1 세포와 CD4⁺ Jurkat 세포를 배양했을 때 syncytia의 형성이 관찰되지 않았고 wild type Envelope 당단백질을 발현할 수 있는 벡터로 transfection한 COS-1 세포와 CD4⁺ Jurkat 세포를 배양했을 때 여러 개의 커다란 다핵의 세포가 형성된 것이 관찰되었다 (Figure 5). 전구체의 gp160 당단백질을 발현하는 벡터로 transfection한 COS-1 세포와 CD4⁺ Jurkat 세포를 배양했을 때 다핵세포가 형성되지 않았음이 관찰되었다. 또한 수용성의 gp160 전구체를 발현하는 벡터로 tran-

sfection한 COS-1 세포와 CD4⁺ Jurkat 세포를 배양했을 때 다핵세포가 형성되지 않았다. 위의 결과에서 보듯이, gp120과 gp41의 cleavage site에서 잘려져 본래의 성숙한 Envelope 당단백질을 생산하는 wild type Envelope 당단백질은 다핵세포를 형성하는 반면, cleavage site에 변이가 일어나 gp120과 gp41로 잘려지지 않은 envelope 당단백질 변이종은 wild type Envelope 당단백질과 같은 조건에서 다핵세포를 형성할 수 없었다. 이러한 결과는 wild type Envelope 당단백질은 gp120과 gp41으로 cleavage가 일어나므로 다핵세포 형성에 필수적이라고 알려진 gp41의 hydrophobic N-terminus가 형성되어 있지만, cleavage가 일어나지 않는 변이종은 gp41의 hydrophobic N-terminus가 생성되지 않으므로 다핵세포가 형성되지 않는다는 사실을 확인시킨다. 이러한 결과들을 통해 볼 때 gp120 부분과 CD4가 결합할 수 있다 하더라도 gp41의 hydrophobic

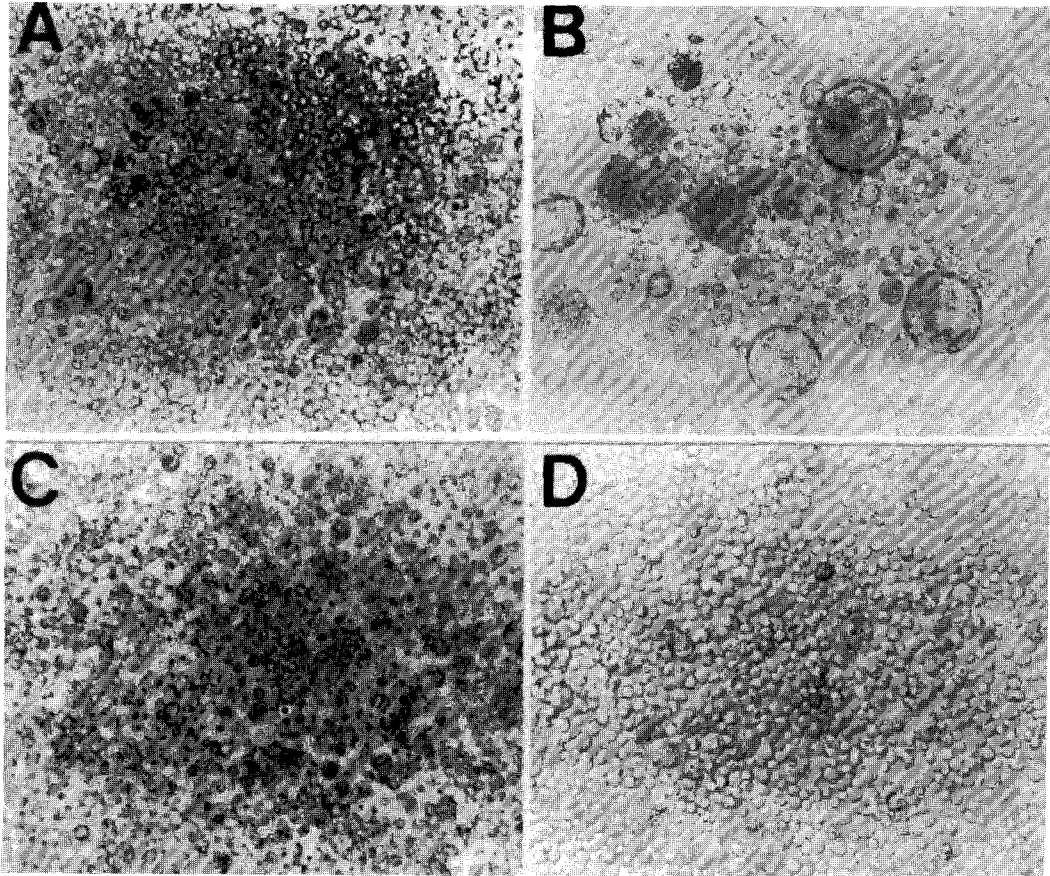


Figure 5. The syncytium-forming ability of the mutant envelope glycoproteins. The ability of the mutant glycoproteins to mediate the formation of syncytia was assessed in COS-1 cells transfected with 10 μ g of the envelope-expressing plasmids by cocultivating with CD4⁺ Jurkat lymphocytes at 48 h after transfection. (A) mock-transfected cells; (B) pENVw.t; (C) pENVc.; (D) pENVc.t.

N-terminus가 없으면 다핵세포가 형성되지 않음을 관찰할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 HIV-1 wild type Envelope 당단백질과 분해자리와 막투과 영역에 변이가 도입된 변이종 Envelope 당단백질들을 진핵세포에서 발현시키는 벡터의 개발 및 이들 벡터로부터 발현된 단백질의 합성과 proteolytic processing, secretion의 유무 및 기능적 특성을 분석하였다. HIV-1 Envelope 당단백질의 구조적, 기능적 그리고 면역학적 특성을 효율적으로 연구하기 위하여 안정하고 충분히 대량의 정제된 단백질을 확보하는 것이 필요하다. 궁극적으로 감염력이 있는 성숙한 바이러

스 입자로부터 Envelope 당단백질의 분리가 가능하나 바이러스 입자는 충분한 양의 단백질을 가지고 있지 않고 안전하지 못한 공급원이다. 그리고 다음과 같은 이유로 바이러스로부터 Envelope 당단백질을 분리하기가 매우 어렵다. gp120 당단백질은 막투과 단백질인 gp41과 비공유결합에 의해 바이러스 입자의 표면에 존재한다 [8,10]. 그러므로 gp120 당단백질을 바이러스 배양액으로부터 정제시 shedding이라는 현상에 의하여 바이러스 입자로부터 쉽게 손실된다 [30]. 이러한 현상은 본 실험에서 확인되었듯이 wild type Envelope 당단백질을 발현하는 세포에서 세포배양액으로 분비된 gp120 당단백질의 존재에 의하여 쉽게 관찰된다. 게다가 막투과 단백질인 gp41은 소수성 특징 때문에 정제과정 중 바이러스 입자로부터 용이하게

회수하기가 어렵다. 특히 분해되지 않은 gp160 당단백질 전구체는 일반적으로 세포배양액으로 분비되지 않는다. 이러한 사실은 본 연구에서 분해되지 않고 전구체로 발현되도록 유도한 벡터에서 생산된 gp160 Envelope 당단백질이 세포내에서만 관찰되고 세포밖으로 분비되지 않았다는 실험결과로부터 확인될 수 있다. 특히 이러한 측면에서 본 연구결과에서 주목할 점은 분해자리의 제거와 막투과 영역의 변이로 인하여 이중 변이를 갖는 Envelope 변이 당단백질은 세포로부터 gp160 전구체 형태로 발현되어 세포배양액에서 용이하게 검출되었다. 이러한 결과는 이 벡터로부터 발현된 단백질은 전구체 형태로 생산된 후 분해자리의 제거와 막투과 영역의 변이로 인하여 세포로부터 gp160 전구체 형태로 세포배양액으로 분비되었다는 것을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 개발된 이 벡터를 이용하면 정제하기 용이한 수용성 HIV-1 Envelope 당단백질을 선택적으로 진행세포에서 발현시킬 수 있어 위에서 언급한 HIV-1 Envelope 당단백질의 문제점을 해결하고 감염의 위험이 없이 대량의 Envelope 당단백질을 얻을 수 있다.

Transfection된 세포에서 발현된 Envelope 당단백질의 세포내에서의 분포를 확인하기 위하여 수행한 면역형광법을 이용한 분석결과는 각 벡터로부터 발현된 당단백질이 secretory pathway를 통하여 합성된 후 세포 표면으로 이동이 되었는지의 유무를 확인시켜 준다 [30,31]. gp160의 전구체를 발현하는 세포에서도 wild type Envelope 당단백질을 발현하는 세포에서와 같이 강한 형광을 보이는 것으로 나타났다. 수용성의 gp160 전구체를 발현하는 세포에서도 어느 정도 강한 형광이 관찰되었다. 이러한 결과는 이미 만들어진 Envelope 당단백질이 배양액으로 분비되지만 일부의 Envelope 당단백질이 세포내에도 존재하는 것을 나타낸다. 이와 같이 면역형광법을 이용하여 Envelope 변이 당단백질의 세포내에서의 발현수준과 분포를 확인할 수 있었다.

다핵세포 형성 실험을 통하여 세포에서 발현된 Envelope 당단백질들이 CD4⁺ 세포에 대하여 세포막 융합의 기능을 가지고 있는지를 비교하였다. 다핵세포는 Envelope가 CD4⁺ T cell과 부착되면 세포막 융합이 일어나고 이렇게 감염된 세포는 주변의 감염되지 않은 T 세포들과 세포막 융합이 일어나서 많은 핵을 가진 거대한 세포로 형성되는 것

을 말한다 [14,15]. 다핵세포를 형성하는 Envelope의 부위는 gp41의 hydrophobic N-terminus로 알려져 있는데, 이 부위는 gp160의 전구체가 gp120과 gp41으로 분리가 일어나야만 생성될 수 있다 [12]. COS-1 세포에서 발현된 Envelope 당단백질과 CD4⁺ Jurkat T 세포와 함께 배양했을 때 발현된 envelope 당단백질이 gp120과 gp41으로 분리가 일어난 경우는 CD4⁺ 세포와 세포막 융합을 유도하여 다핵세포를 형성시킬 수 있었다. 그러나 cleavage site에 변이가 일어나 gp41의 hydrophobic N-terminus가 생성되지 않는 envelope 변이 당단백질은 다핵세포를 형성할 수 없었다. 이러한 결과는 바이러스의 숙주세포 감염시 Envelope 당단백질의 cleavage가 매우 중요함을 확인하여 준다 [7,18]. 바이러스가 숙주세포에 감염할 때 HIV-1 외피 당단백질인 gp120은 바이러스의 수용체인 CD4 당단백질과 상호반응하여 바이러스가 숙주세포에 결합하도록 유도한다 [22].

결 론

본 연구에서는 HIV-1 Envelope 당단백질의 생물학적, 구조적 특성을 효율적으로 연구하기 위하여 HIV-1 바이러스의 구성 성분 중 유전자 조작을 이용하여 선택적으로 여러가지 유형의 HIV-1 Envelope 당단백질을 진행세포에서 발현시킬 수 있는 expression system을 확립하고 여러가지 Envelope 당단백질의 변이종을 진행세포에서 발현시켜 발현된 당단백질의 합성, proteolytic processing, secretion 유무 및 구조적 특성을 분석한 결과 분리하기 용이한 수용성 HIV-1 gp160 당단백질을 진행세포에서 발현시키는 벡터를 확보할 수 있었다. 이 벡터 체계를 이용하여 AIDS 진단시약이나 백신 개발을 위하여 중요한 목표물이 되는 HIV-1 Envelope 당단백질을 안전하고 정제하기 용이한 수용성 당단백질의 형태로 생산하는 기술을 개발할 수 있을 것이다. 또한 정제가 용이한 HIV-1 Envelope 당단백질을 이용하여 이 단백질의 구조적, 기능적 그리고 면역학적 특성을 효율적으로 연구할 수 있는 체계를 확립할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(유전공학) 지원에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) **Allan JS, Coligan JE, Barin F, McLane MF, Sodroski J, Rosen CA, Haseltine WA, Lee TH and Essex M:** Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* **228**: 1091-1093, 1985.
- 2) **Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA and Weiss RA:** A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* **67**: 3649-3652, 1993.
- 3) **Cann AJ and Karn J:** Molecular biology of HIV-1: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* **3 (Suppl 1)**: S19-S34, 1989.
- 4) **Coffin JM:** Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* **46**: 1-4, 1986.
- 5) **Fauci AS:** The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**: 617-622, 1988.
- 6) **Gabuzda D, Olshevsky U, Bertani P, Haseltine WA and Sodroski J:** Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor. *J Acquired Immune Defic Syn* **4**: 34-40, 1991.
- 7) **Gallaher WR:** Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**: 327-328, 1987.
- 8) **Haffar OK, Dowbenko DJ and Berman PW:** Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J Cell Biol* **107**: 1677-1687, 1988.
- 9) **Hahn B, Shaw JM, Taylor ME, Redfield RR, Markham PO, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC, Parks ES and Parks WP:** Genetic variation in HTLV-III/LAB over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* **232**: 1548-1553, 1986.
- 10) **Helseth E, Olshevsky W, Furman C and Sodroski J:** Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**: 2119-2123, 1991.
- 11) **Katz RA and Skalka AM:** Generation of diversity in retroviruses. *Annu Rev Genet* **24**: 409-445, 1990.
- 12) **Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, W. Goh G, Terwilliger E, Dayton A, Rosen C, Haseltine W and Sodroski J:** Functional regions of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Science* **237**: 1351-1355, 1987.
- 13) **Kozarsky K, Penman M, Basiripour L, Haseltine W, Sodroski J and Krieger M:** Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Acquir Immune Defic Syn* **2**: 163-169, 1989.
- 14) **Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T and Capon DJ:** Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**: 975-985, 1987.
- 15) **Layne SP, Merges MJ, Dembo MB, Spouge JL and Nara PL:** HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature (London)* **346**: 277-279, 1990.
- 16) **Leonard C, Spellman M, Riddle L, Harris R, Thomas J and Gregory T:** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**: 10373-10382, 1990.
- 17) **Matthews T, Langlois A, Robey W, Chang N, Gallo R, Fischinger R and Bolognesi D:** Restricted neutralization of divergent human T-lymphotropic virus type III isolated by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 9709-9713, 1986.
- 18) **McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman MB, Kossek JC, Reys GR and Weissman IL:** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**: 55-67, 1988.
- 19) **McKeating J, Thali M, Furman C, Karwowska S, Gorny M, Cordell J, Zolla-Pazner S, So-**

- droski J and Weiss R:** Amino acid residues of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 critical for the binding of rat and human neutralizing antibodies that block the gp120-sCD4 interaction. *Virology* **190**: 134-142, 1992.
- 20) **Moore JP and Ho DD:** Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected human. *J Virol* **67**: 863-875, 1993.
- 21) **Myers G, Berzofsky J, Korber B, Smith R and Pavlakis G:** Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. M. 1992.
- 22) **Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haelstine WA and Sodroski JG:** Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol* **64**: 5701-5707, 1990.
- 23) **Park J:** Development and utilization of an human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based retroviral vector system to express HIV-1 envelope glycoprotein in CD4+ T cells. *J Kor Soc Virol* **26**: 141-150, 1996.
- 24) **Park J and Morrow CD:** The nonmyristylated Pr160^{gag-pol} polyprotein of human immunodeficiency type 1 interacts with Pr55^{gag} and is incorporated into viruslike particles. *J Virol* **66**: 6304-6313, 1992.
- 25) **Starcich B, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC and Wong-Staal F:** Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**: 637-648, 1986.
- 26) **Steimer KS, Scandella CJ, Skiles PV and Hargwood NL:** Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to gp120. *Science* **254**: 105-108, 1991.
- 27) **Thali M, Furman C, Ho DD, Robinson J, Tillely S, Pinter A and Sodroski J:** Discontinuous, conserved neutralization epitopes overlapping the CD4 binding region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* **66**: 5635-5641, 1992.
- 28) **WHO:** The HIV/AIDS pandemic: Overview (Document WHO/GPA/CNP/GVA/ 93.1, Global program on AIDS, Geneva, 1993), 1993.
- 29) **Westervelt P, Gendelman H and Ratner L:** Identification of a determinant within the human immunodeficiency virus type 1 surface envelope glycoprotein critical for productive infection of primary monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3097-3101, 1991.
- 30) **Willey RL, Bonifacino JS, Potts BJ, Martin MA and R. D. Klausner RD:** Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9580-9584, 1988.
- 31) **Willey RL, Klimkait T, Frucht DM, Bonifacino JS and Martin MA:** Mutations within the human immunodeficiency virus type 1 gp160 envelope glycoprotein alter its intracellular transport and processing. *Virology* **184**: 319-329, 1991.