

T 세포 특이적 전사인자인 LyF-1과 HIV-1 Nef의 상호 작용

배재대학교 자연과학대학 생명과학부, 바이오의약 RRC

이미선 · 이경화 · 김정우

=Abstract=

Interaction between HIV-1 Nef and LyF-1, the T Cell Specific Transcription Factor

Mi Seon Lee, Kyoung Hoa Lee and Jung Woo Kim

Bio-Med RRC and Division of Life Science, Pai-Chai University, Taejon 439-6, Korea

Nef is a lentiviral protein involved in pathogenesis of AIDS, but its molecular mechanism of action remains incompletely understood. Here we report the isolation of the interacting protein with the HIV-1 Nef, using the yeast two hybrid system for expression cloning. One of the positive colonies was selected as the final candidate for the interacting protein gene. The nucleotide sequencing revealed that this interacting protein is Human Ikaros/LyF-1. This protein interacted with the C-terminal region of Nef specifically in yeast system, not with the N-terminal region. This interaction was also confirmed by *in vitro* binding assay.

Key Words: Yeast two hybrid assay, HIV-1, Nef, Human Ikaros/LyF-1

서 론

AIDS (Acquired Immune deficiency syndrom)은 1980년대 초에 처음 알려진 질병으로, HIV-1이 AIDS의 원인균이라는 사실이 밝혀진지 10여 년이 지난 오늘에도 정확한 HIV와 숙주세포와의 상호 작용에 관한 연구는 밝혀지지 않은 부분이 많다. HIV-1에 감염된 환자는 면역반응을 조절하는데 중요한 역할을 하는 CD4⁺ T 세포의 점진적 감소로 인하여 인체의 면역기능이 저하되고 궁극적으로 면역결핍 상태에 도달하게 되어 여러 가지 질병에 걸려 사망에 이르게 된다. 면역기능 상실에 관여하는 바이러스 단백질로 Nef 단백질이 연구되고 있고, Nef 단백질이 T 세포를 비정상적으로 활성화시킨다는 보고가 있지만 아직 확실히 그 작용 기작이 밝혀지고 있지 않다 (5). Nef 단백질

은 HIV-1 입자내에 존재하며, 바이러스 감염 후 제일 먼저 발현되는 단백질로 바이러스 입자가 생성되기 전에 만들어지며, 초기에 생성되는 multiply spliced mRNAs의 약 80%가 Nef 단백질을 발현시킨다. 따라서, HIV-1의 증식을 증가시키고, AIDS 유발에 필수적이라고 보고되고 있다 (7,10). Nef 단백질은 27 KDa으로 myristoylation 되는 단백질이고 주로 세포질과 세포막에 존재하고 있으며 (8), 일부 감염된 세포의 핵에서도 발견된다 (20). Nef 단백질 N 말단에서의 myristoylation은 Nef 단백질의 세포내 위치 결정에 필수적이며, Nef 단백질의 기능에 중요하다 (1,5,6,18). 그리고, *in vivo*에서 Nef의 기능에 필요한 부분이 규명되었는데, 이는 바이러스 감염 후 pathogenesis에 필요한 부분만을 의미하는 것으로, PXXP 구조를 포함하는 SH3 결합 부위가 그 부분으로 나타났다 (11). 그리고, SIV와 HIV-1 Nef 단백질은 Src Ki-

접수 : 2000년 10월 16일, 논문게재확정 : 2000년 11월 4일

*; 책임저자: 김정우, 대전시 서구 도마2동 439-6, 배재대학교 생명과학부, 바이오의약 RRC
Tel: 042-520-5613, Fax: 042-520-5613, E-mail: jwk@mail.paichai.ac.kr

nase 활성화전이 서로 다른 양상을 보이는데, 이러한 결과는 Nef와 Src kinase가 결합할 때, 다양한 작용기전을 가지고 있음을 의미하는 것이다 (2). 또한, Nef 단백질의 C-terminal 부위는 c-Raf1 kinase와 결합한다는 보고가 밝혀졌고, 그 위치는 Nef 단백질의 carboxyl-terminal 부위인 Asp/Glu-Asp-X-X-X-Glu (aa 174~179)와 c-Raf1의 Asp-Pro-Thr-Ile-Glu-Asp (aa 33~38) 부분으로 알려졌다 (9). Nef 단백질의 발현으로 인하여 야기되는 변화는 세포표면에 존재하는 CD4 항원의 표면 발현 감소, T 세포의 활성화 상태의 억제 혹은 유도, inositol triphosphate receptor의 기능 억제, HIV long terminal repeat (LTR)에 대한 영향 등이 관찰되었다 (3,5,19,21,22). 이러한 Nef 단백질의 다양한 효과는 Nef 단백질이 아마도 세포 유형에 따라 여러 가지 세포 경로에 영향을 미칠 수 있다는 것을 제시한다. 이와 같이 바이러스에 감염된 세포에서 지속적으로 관찰되는 Nef 단백질의 여러 가지 효과로 인하여 신호 전달 경로의 조절을 통한 세포 활성화에 대한 영향, 바이러스 감염력의 증가 등이 바이러스에 감염된 환자의 면역 결핍 상태를 유도하는데 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 세포에서 Nef 단백질의 발현으로 인하여 야기되는 변화는 T 세포 활성화 상태의 억제 및 유도 등을 생각할 수 있다. 이에 대한 연구로는 Nef 단백질이 자극 의존적으로 T 세포의 활성을 증가시킨다는 보고를 들 수 있다. 이는 PMA, ionomycin과 같은 mitogen으로 활성화시킨 T 세포는 Nef의 발현에 영향을 받지 않았으나, T cell receptor를 통해 자극될 경우 Nef는 IL-2의 분비를 증가시킨다는 연구로, 이는 Nef의 myristoylation에 의존적으로 일어나는 것으로 알려지고 있다 (12). 한편, 최근에는 막에서 발현되는 Nef는 TAR과 kB cis element 의존적으로 Tat의 존재하에 LTR 활성을 증가시킨다는 보고도 있다 (13).

본 연구에서는, HIV-1 Nef 단백질의 G protein과 homology를 갖는 부위를 bait로 하여 이와 결합하는 단백질을 Yeast two hybrid system을 이용하여 찾고자 하였다. Yeast two hybrid system은 protein-protein interaction trap을 이용하여 특정 단백질과 상호 작용하는 단백질의 유전자를 분리해내는 system으로 잘 알려져 있다 (14~17).

재료 및 방법

1. DNA construct

Nef 유전자를 모두 LexA가 fusion된 단백질을 효모에서 발현시킬 수 있는 plasmid를 구축하기 위해 pLexA vector에 subcloning 하였다. 먼저 *EcoRI*과 *Sall* site가 붙어 있는 oligonucleotide를 고안하여 Nef-full length (5'-gaattcatgggtggcaagtgtgc-3'와 5'-gtcgcactcagcagttcttgaagta-3'), Nef Δ 1 (5'-gaattcatgggtggcaagtgtgc-3'와 5'-gtcgcactaatctacagctgccttga-3'), Nef Δ 2 (5'-gaattcctagccacttttaaaagaa-3'와 5'-gtcgcactcagcagttcttgaagta-3')를 각각 조제하였다. 이들을 이용하여 HXB2CG를 template로 하고 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 3분의 반응을 35회 반복하는 polymerase chain reaction (PCR)을 하여 DNA 단편을 얻었다. 각 DNA 단편의 말단을 phosphorylation, polymerization 시킨 후, pBlueScript K/S vector에 blunt end로 ligation 하고, *EcoRI*과 *Sall*으로 절단하여, yeast two hybrid 벡터인 pLexA에 삽입함으로써 결과적으로 pLexA/Nef와 pLexA/Nef Δ 1, pLexA/Nef Δ 2를 얻었다.

Nef 각 부위의 단백질 발현을 위해, pMal-cR1 vector에 subcloning 하였다. pBluscript K/S vector에 cloning 되어 있던 Nef, Nef Δ 1, Nef Δ 2를 각각 *EcoRI*과 *Sall* site를 이용하여, pMal-cR1 vector의 *EcoRI*과 *Sall* 부위에 삽입하였다.

pcDNA3 (Invitrogen)에 cloning된 LyF-1 유전자는 Howard Hughes Medical Institute의 Dr. Brad에게서 받았다. 이 construct를 template로 하여, 5'-ggcggaa-ttcgatgctgatgagggtcaag-3', 5'-ggcgcctcagtagctcatg-tggaagcgggtgc-3'의 oligonucleotide를 이용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다. 얻어진 DNA 단편을 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 pcDNA3에 *EcoRI*과 *XhoI*으로 삽입하였다.

2. Human cDNA library를 이용한 Nef Δ 2 결합 단백질 유전자 검색

LexA/Nef Δ 2 융합 단백질이 포함된 효모 EGY 048 [*MAT α* , *his3*, *trp1*, *ura3*, *lexA_{op}(\times 6)*-*LEU2*]를 competent cell로 하고 lithium acetate 방법을 이용하여 yeast two hybrid용 Jurkat cDNA library를 carrier DNA와 1 : 100의 비율로 섞은 후 transformation 하였다. 이 cDNA fragment는 pYESTrp의 *EcoRI*과 *XhoI* site에 cloning 되어 있고, galactose

존재하에서만 융합 단백질이 발현되도록 하는 *Gall* promoter가 존재하고 있다. 따라서, cDNA가 이 효모에 도입된 transformants는 tryptophan prototrophy (plasmid marker) 성질을 나타내어 합성 배지인 Ura-, His-, Trp-에서 선별이 가능하다. 합성배지 (Ura-, His-, Trp-)에서 자란 모든 transformants를 수확하여 2% galactose가 포함된 합성배지 (Ura-, His-, Trp-, Leu-)에 plating 하여 cDNA가 도입되어 있는 *LexA/Nef Δ 2* fusion 단백질과 상호작용하는 효모 세포를 선별하였다.

3. 선별된 효모의 galactose 의존성 조사

선별된 효모 세포의 성장이 galactose에 대한 의존성 여부를 알아보기 위해 2% galactose (inducing condition)가 포함된 합성배지 (Ura-, His-, Trp-, Leu-)과 2% glucose (non-inducing condition)가 포함된 합성배지에 접종하였다. Galactose를 함유하는 배지에서는 잘 성장하고 glucose를 함유하는 배지에서는 성장하지 않는 특징을 나타내는 효모 세포를 선택하여 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-a-galactopyranoside (X-gal)와 2% glucose나 2% galactose가 포함된 합성배지 (Ura-, His-, Trp-)에 streak 하여 β -galactosidase의 활성을 조사하였다. 단지 galactose 존재하에서만 reporter gene이 발현되는 효모를 선택하여 액체배지에서 키운 후 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid를 *E. coli* XL1-blue strain (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *lac*, [F', *proAB**, *lac*^qZ Δ M15, ::Tn10 (Tet^r)]에 transformation 하여 LB/amp^r에서 선택적으로 성장하는 균을 선별하였다. 선별된 *E. coli*를 다시 액체배지에서 키우고 plasmid를 분리하여 이것이 library 유래의 plasmid임을 확인한 후 그 염기서열을 sequencing 하여 결정하였다.

4. 후보 단백질 유전자의 염기서열 결정

분리된 library plasmid의 염기서열을 조사하기 위해 library cDNA가 포함된 *E. coli*를 1.5 ml eppendorf tube에 3 ml를 12,000 rpm, 30초 원심분리하여 수확하였다. 여기에 resuspend solution, cell lysis solution, neutralization solution을 순서대로 넣은 후 12,000 rpm, 5 min 동안 원심분리 하였다. 상등액을 취해서, 동량의 phenol : chloroform (1 : 1)을 첨가하고 2 min 동안 vortex 하였다. 그리고, 12,000 rpm, 5 min 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 새로운 tube에 옮기고 ethanol precipitation 과

정을 수행하고, 6 μ l 증류수로 침전을 녹였다. 여기에 sequencing buffer (USB kit) 2 μ l, pYESTrp primer 2 μ l를 첨가한 후 이 mixture를 65 $^{\circ}$ C, 2 min 동안 반응시켜 primer를 annealing 시켰다. 이 mixture에 dilute labeling mixture를 첨가하고 이 용액을 37 $^{\circ}$ C, 5 min간 incubation 한다. 이때 ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) 각각을 2.5 μ l씩 독립된 tube에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 pre-incubation 하였다. 그 다음 3.5 μ l씩 각각의 ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP가 들어 있는 tube에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5 min 동안 반응한 후 termination solution 4 μ l를 첨가하여 75~80 $^{\circ}$ C, 5 min 동안 반응하고 빠르게 ice bath로 옮겼다. 이렇게 반응시킨 sample을 1500 V에서 2~3시간 동안 gel run 하였다. Sequencing gel은 40% acrylamide를 final 6% acrylamide와 final 1X TBE, 45% Urea를 넣고 heating 하여 녹인 후, 3 MM paper로 filtration 한 후, final volume을 증류수로 맞추었다. 그리고, 500 μ l의 APS와 30 μ l의 TEMED를 넣고, gel을 casting한 sequencing plate에 조심스럽게 부었다. Gel이 굳으면, gel run 2시간 전에 pre-run을 1시간 혹은 30 min 정도하고 running 순서는 A, C, G, T 순으로 하였다. 반응이 끝난 gel을 80 $^{\circ}$ C로 heating 하여 gel dryer로 말린 후 필름을 넣고 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하여 2~3일 후 현상하여 nucleotide sequence를 분석하고 homology search 하여 어떤 gene과 homology가 있는지 확인하였다.

5. Protein expression

MBP/Nef, Nef Δ 1, Nef Δ 2 벡터를 bacteria XL-1 blue에 transformation 하여 얻은 transformant를 2 ml 1% glucose가 포함된 LB ampicillin 배지에서 37 $^{\circ}$ C, O/N으로 배양한 후에 1% glucose가 포함된 LB ampicillin 18 ml로 transfer 하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 키우고 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (Sigma)를 넣고 4시간 induction 시켰다. 이때 control로 MBP only도 동일 조건에서 실험하였다. 그런 다음 4 $^{\circ}$ C, 5000 rpm, 10 min 동안 원심분리 하였다. 상등액은 버리고 1 ml 세포 lysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.4 mM PMSF)로 resuspend 하여 2분 동안 sonication 한 후 4 $^{\circ}$ C, 5000 rpm, 10 min 동안 원심분리 하여 supernatant를 new tube로 옮기고 10 μ l를 취해서 6 \times SDS sample buffer 3 μ l를 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 heating 한 후 10%

SDS PAGE에 loading 하여 단백질이 발현되었는지 확인하였다. 그 중 500 µl에 amylose resin (Novagen) 50 µl를 넣고 4°C에서 O/N로 결합시켰고, 세포 lysis buffer 300 µl를 넣어 2번 세척하였다.

6. *In vitro* binding assay

TNT T7 transcription/translation kit (Promega)를 이용하여 LyF-1을 *in vitro* translation 반응을 수행하였다. 반응은 TNT T7 Quick Master Mix를 40 µl, [³⁵S]-methionine (10 µCi/µl)을 2 µl, template인 pcDNA3/LyF-1을 1.5 µg, nuclear free water를 넣어 final volume 50 µl로 하여, 30°C에서 90 min 동안 반응하였다. 그리고, 발현된 단백질 NefΔ2에 amylose resin을 붙인 상태에 *in vitro* translation 시킨 LyF-1을 4°C에서 O/N으로 결합시킨 후 wash buffer로 3번 세척하고, 6×SDS sample buffer를 넣고 100°C에서 3분 동안 heating 한 후 10% SDS PAGE gel에 loading 하여, 전기영동이 끝난 후 gel을 3MM paper로 옮겨 80°C에서 건조하고, BAS Image analyzer를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. pEG202/Nef plasmid의 구축

검색시에 비특이적으로 상호 작용을 나타내는

false positive colony 수를 줄이기 위하여, Nef 단백질의 N 말단 (SH3 결합부위; NefΔ1)과 C 말단 (G protein과 homology 있는 부위; NefΔ2)을 분리한 검색용 vector를 만들어 검색했다. 본 실험에서 사용한 bait는 HIV-1 NefΔ2로 구성되어 있고 아미노산 87~207 부위이며, 별도의 실험을 위해 Nef (aa 2~207), NefΔ1 (aa 2~86)을 이용하였다 (Figure 1). NefΔ1 부분은 SH3가 결합하는 부위인 PxxPxxPxxP를 함유하는 부분이다.

2. Library screening 및 결합 단백질 유전자의 분리

Human Jurkat cDNA library를 이용하여 HIV-1 NefΔ2와 결합하는 단백질을 찾기 위해 screening을 하였다. Jurkat cDNA는 pYESTrp vector에 insert되어 있다. Screening시 UHW⁻/glc 배지에서 자란 colony 수가 1.0×10⁶개였으며, 이 중에서 UHWL⁻/gal 배지에서 자란 colonies를 가지고 X-gal filter assay를 하였고, 그 결과 나타난 blue colony 264개를 UHW⁻/glc plate로 옮겼으며, 이 colony로 X-gal test와 auxotroph test를 거쳐 31개의 colony를 확보했다. 이중 재확인 과정을 통해 얻은 colony는 24개였다. 이 24개 colony를 W⁻/glc plate에서 3번 계대배양 한 후에 W⁻/glc 액체배지에서 배양한 후, plasmid를 분리하여 electroporation법으로

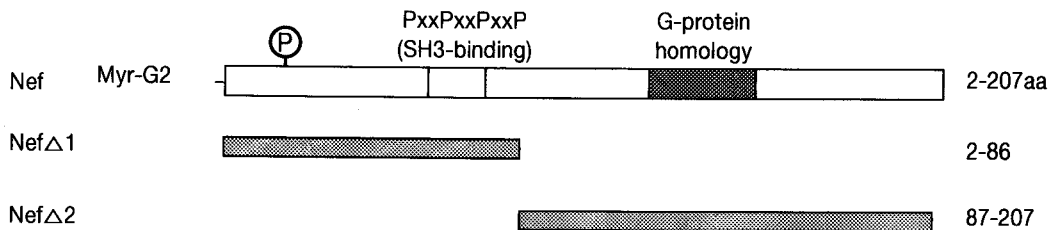


Figure 1. Nef full-length sequence, and deletion mutants analyzed in this work. The N-terminal myristic acid adduct (myr) linked to Gly2, a protein kinase C site. (Thr15; circled P), the SH3-binding motif (aa 69~78), and a putative G-protein homology (aa 95~111) are depicted (top).

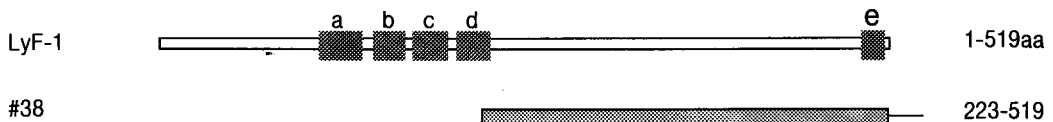


Figure 2. Nucleotide sequence comparison between the genes for isolated plasmids (#38) from the candidate yeast and for the homologous protein, LyF-1. a~e represent the zf (zinc finger) domain. a: zf C2H2 117~139 aa, b: zf C2H2 145~167 aa, c: zf C2H2 173~195 aa, d: zf C2H2 201~224 aa, e: zf C2H2 490~514 aa. C: Cysteine, H: Histidine

Table 1. Galactose inducible promoter test and β -galactosidase activity test for the isolated plasmid #38

A. Galactose-inducible promoter test			
Prey \ Bait		LexA/ Nef Δ 1	LexA/ Nef Δ 2
Plasmid #38	UHWL ⁻ /Glc ^a	No growth	No growth
	UHWL ⁻ /Gal ^b	No growth	Growth
B. β -galactosidase activity test			
Prey \ Bait		LexA/ Nef Δ 1	LexA/ Nef Δ 2
Plasmid #38	UHW ⁻ /Glc ^c	White	White
	UHW ⁻ /Gal ^d	White	Blue

Bait: fused to DNA-binding domain
 Prey: fused to transcription activation domain
 a: CM Ura-, His-, Trp-, Leu-/2% glucose
 b: CM Ura-, His-, Trp-, Leu-/2% galactose
 c: CM Ura-, His-, Trp-/2% glucose + X-gal
 d: CM Ura-, His-, Trp-/2% galactose + X-gal

*E. coli*에 transformation 하여 library 유래의 cDNA 를 찾았다. 이때 *Xba*I로 Jurkat cDNA library와 비교하고, *Eco*RI과 *Xho*I double digetion으로 pY-EStrp에 cloning 되어 있는 insert의 size를 각각 확인하였다. 그 중 38번 유전자를 sequencing을 통하여 LyF-1임을 확인하였다 (Figure 2). 효모에서 분리한 LyF-1을 *Eco*RI과 *Xho*I로 절단한 결과, LyF-1의 약 1000 bp를 포함하고 있었으며 LyF-1의 coding sequence 부분은 nucleotide 169~1728 bp 부분이며, 효모에서 분리한 후, sequencing한 부분은 nucleotide 836~1800 bp 부분으로, full-length의 LyF-1을 포함하고 있지는 않았다.

3. HIV-1 Nef Δ 2와 LyF-1의 *in vitro* 상호 작용

HIV-1 Nef Δ 2와 LyF-1이 효모에서 상호 작용하고 있음을 확인하였다 (Table 1). 그런데, HIV-1 Nef Δ 1과 LyF-1도 마찬가지로 상호 작용하는지 조사하기 위하여, β -galactosidase 활성 조사와 galactose-inducible promoter test를 수행하였으나, HIV-1 Nef Δ 2와는 달리, HIV-1 Nef Δ 1에서는 그 상호 작용을 확인할 수 없었다.

한편, 이 HIV-1 Nef Δ 2와 LyF-1이 *in vitro*에서도 상호 작용하는지를 알아보기로 하였다. HIV-1 Nef를 maltose 결합 단백질과 융합시키기 위해

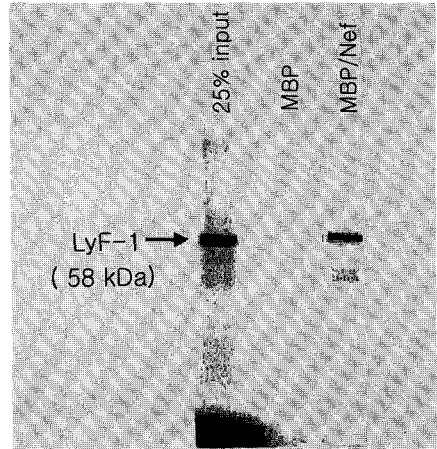


Figure 3. *In vitro* binding assay between Nef and LyF-1. ³⁵S-LyF-1, prepared by *in vitro* transcription and translation, was incubated with bacterially expressed MBP (lane 2) and MBP/Nef (lane 3). Amylose resin beads were added to each reaction mixture and this was incubated to allow binding of the beads to MBP. The bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

pMal-cR1 vector (46 kDa)에 construction 하고 이 단백질을 발현시켰다. 이렇게 발현된 단백질이 정상적인 Nef 단백질인지를 확인하기 위해 rabbit anti-Nef antiserum (NIH)을 이용하여 western blot을 수행하였다 (data not shown). 또한, negative control로 유전자가 construction 되어 있지 않은 pMal-cR1 vector만으로도 단백질을 발현시켰다. 발현된 단백질 MBP와 MBP-Nef 융합 단백질을 amylose resin을 이용하여 정제하였다.

pCNA3에 construction 되어 있는 LyF-1은 TNT T7 transcription/translation kit (Promega)를 이용하여 *in vitro* translation 반응을 수행하여 [³⁵S]-methionine으로 labelling된 단백질을 생성시켜 detection이 가능하도록 하였다. 이렇게 각각 준비한 Nef 단백질과 LyF-1 단백질을 혼합하여 4℃에서 rotator를 이용하여 섞으면서 24시간 동안 결합시키고 세척 후, 전기영동하여 건조 후 autoradiography로 조사한 결과, MBP 자체 보다 MBP-Nef 융합 단백질과 LyF-1이 함께 존재할 때, 그 결합이 더 강한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3).

고 찰

바이러스가 세포내에서 증폭되어 다시 세포밖

으로 assembly 되는 과정 동안에 바이러스내 단백질과 상호 작용하는 세포내 단백질은 많이 존재하리라 예상되어지고 있으나, 그 정확한 상호 작용의 기작은 아직 알려지지 않고 있는 상황이다. HIV-1 Nef 단백질은 HIV-1 입자내에 존재하며, 바이러스 감염 후 제일 먼저 발현되는 단백질로 바이러스 입자가 생성되기 전에 만들어지며, 초기에 생성되는 multiply spliced mRNAs의 약 80%가 Nef 단백질을 발현시킨다. 따라서, HIV-1의 증식을 증가시키고, AIDS 유발에 필수적이라고 보고되고 있다. 이 과정 도중에 HIV-1 Nef와 상호 작용하는 세포내 단백질을 알아보려고 하였다.

본 연구는 HIV-1의 Nef 중 G protein과 homology를 갖고 있는 부위를 bait로 하여, yeast two hybrid system을 이용하여 검색하였고, 그 결과 HIV-1 Nef-Nef Δ 2는 T 세포 특이적인 전사인자인 LyF-1과 상호 작용하고 있음을 알 수 있었다. LyF-1은 lymphoid transcription factor로 알려져 있으며, alternative splicing에 의해 splice form으로 Ik-1, Ik-2, Ik-5가 있다 (19). 그리고, MUNC18-1 단백질의 경우, genomic structure에 LyF-1의 DNA 결합부위를 갖고 있어, 이 부분에 LyF-1이 결합하리라 생각되어진다 (25). Human LyF-1은 5개의 zinc finger domain을 포함하고 있으며, 이 부분은 C2H2 zinc finger type으로 전형적인 zinc finger domain이다. Human LyF-1에 관한 연구는 98년 이후로 거의 진행되고 있지 않은 상태이며, 본 연구에서 Nef 단백질과 결합하고 있음을 효모를 이용한 실험에서 보였으며, *in vitro*에서 Nef 단백질과 상호 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. Nef 단백질이 LyF-1과 결합하여 나타낼 수 있는 기능을 여러 가지로 생각할 수 있으나, 아직 그 기능에 대한 실험 결과는 알려진 것이 없다. 그러나, 본 연구 결과로 인해 바이러스가 감염되어 나타나는 세포내 유전자의 전사 억제 현상을 이 Nef와 LyF-1의 상호 작용으로 설명할 수도 있다는 가능성을 제시하였다는 것에 의의가 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부, 과학재단 지원 바이오 의약 RRC 연구비로 진행되었으므로 이에 감사드린다.

참 고 문 헌

1) Aiken C, Konner J, Laudau NR, Lenburg

ME, Trono D: Nef Induces CD4 Endocytosis: Requirement For a Critical Dileucine Motif In the Membrane-proximal CD4 Cytoplasmic Domain. *Cell* 76: 853, 1994.

2) Alison LG, Helene D, Kelly AI, Dale AM, Daniel O, Yves C: Simian Immunodeficiency Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1 nef Proteins Show Distinct Patterns and Mechanisms of Src Kinase Activation. *J Virol* 73: 6152-6158, 1999.

3) Anderson S, Shugars DC, Swanstrom R, Garcia JV: Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 suppresses surface CD4 expression in human and mouse T cells. *J Virol* 67: 4923, 1993.

4) Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM: HIV-1 Nef Leads to Inhibition Or Activation of Cells Depending On Its Intracellular Localization. *Immunology* 1: 373, 1994.

5) Chowes MY, Spina CA, Kwob TJ, Fitch NJ, Richman DD, Guatelli JC: Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J Virol* 68: 2906, 1994.

6) Coates K, Harris M: The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein functions as a protein kinase C substrate in vitro. *J Gen Virol* 76: 837-844, 1995.

7) Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89: 263-273, 1997.

8) Hodge DR, Dunn KJ, Pei GK, Chakrabarty MK, Heidecker G, Lautenberger JA, Samuel KP: Binding of c-Raf1 Kinase to a Conserved Acidic Sequence within the Carboxyl-terminal Region of the HIV-1 Nef Protein. *J Biol Chem* 273: 15727-15733, 1998.

9) Foti M, Mangasarian A, Piguet V, Lew D, Krause K, Trono D, Carpentier J: Nef-mediated clathrin coated pit formation. *J Cell Biol* 139: 37-47, 1997.

10) Franchini G, Robert-Guroff M, Ghayeb J, Chang NT, Wong-Staal F: Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' orf protein in cultured

- T cells. *Virology* **155**: 593-599, 1986.
- 11) **Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA:** CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**: 1955-1958, 1996.
 - 12) **Grace MA, Lianying G, Gregory B, Jerome AZ:** Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1 nef Required for Function *In Vivo*. *J Virol* **72**: 7032-7039, 1998.
 - 13) **Hahm K, Ernst P, Lo K, Kim GS, Turck C, Smale ST:** The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* **14**: 7111-7123, 1994.
 - 14) **Hua C, Jennifer T, Wade PP:** Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Activation Induced by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax protein Is through Cooperation of NF-kB and Tat. *J Virol* **72**: 6911-6916, 1998.
 - 15) **Moore JP, Jameson BA, Sattentau QJ, Willey R, Sodroski J:** Towards a structure of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120: an immunochemical approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **342**: 83-88, 1993.
 - 16) **Koshichi G, Hiroshi Y, Eriko K, Toshio W, Michio O:** Genomic structure of MUNC18-1 protein, which is involved in docking and fusion of synaptic vesicles in brain. *J Biol Chem* **273**: 21642-21647, 1998.
 - 17) **Liu LX, Margottin F, Gall SL, Schwartz O, Selig L, Benarous R, Benichou S:** Binding of HIV-1 Nef to a Novel Thioesterase Enzyme Correlates with Nef-mediated CD4 Down-regulation. *J Biol Chem* **272**: 13779-13785, 1997.
 - 18) **Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, Berlioz-Torrent C, Liu L, Benarous R, Heard JM, Schwarz O:** Nef interacts with the μ subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC-I molecules. *Immunity* **8**: 483-495, 1998.
 - 19) **Michelangelo F, Aram M, Vincent P, Daniel PL, Karl-Heinz K, Didier T, Jean-Louis C:** Nef-mediated Clathrin-coated Pit Formation. *J Cell Biol* **139**: 37-47, 1997.
 - 20) **Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow Ed, Boeke JD:** Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *PNAS* **93**: 10315-10320, 1996.
 - 21) **Niederman TM, Garcia JV, Hastings WR, Luria S, Ratner L:** Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kappa B induction in human T cells. *J Virol* **66**: 6213, 1992.
 - 22) **Ranki A, Nyberg M, Ovod V, Haltia M, Elovaara I, Raininko R, Haapasalo H, Krohn K:** Abundant expression of HIV Nef and Rev proteins in brain astrocytes in vivo is associated with dementia. *AIDS* **9(9)**: 1001-1008, 1995.
 - 23) **Rhee SS, Marsh JW:** HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement. *J Immunol* **152**: 5128-5134, 1994.
 - 24) **Schwartz O, Riviere Y, Heard JM, Danos O:** Reduced cell surface expression of processed human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the presence of Nef. *J Virol* **67**: 3274, 1993.