

C형 간염바이러스 E2 단백질에 결합하는 추정 세포수용체 cDNA의 클로닝

이성락 · 백재은 · 석대현 · 박세광 · 최인학*

인제대학교 의과대학 미생물학교실

Cloning of cDNA Encoding Putative Cellular Receptor Interacting with E2 protein of Hepatitis C Virus

Sung-Rak Lee, Je-Eun Paik, Dae-Hyun Sug, Sae-Gwang Park and In-Hak Choi*

Department of Microbiology, College of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea

Abstract

E2 glycoprotein of hepatitis C virus (HCV) comprises a surface of viral particle together with E1 glycoprotein, and is thought to be involved in the attachment of HCV viral particle to receptor (s) on the permissible cells including hepatocytes, B cells, T cells, and monocytes. We constructed a phage library expressing cellular proteins of hepatocytes on the phage surface, which turned out to be 8.8×10^5 cfu of diversity and carried inserts in 95% of library. We screened both cDNA phage library and 12-mer peptide library to identify the cellular proteins binding to E2 protein. Some intracellular proteins including tensin and membrane band 4.1 which are involved in signal transduction of survival and cytoskeleton organization, were selected from cDNA phage library through several rounds of panning and screening. On the contrary, membrane proteins such as CCR7, CKR-L2, and insulin-like growth factor-1 receptor were identified through screening of peptide library. Phages expressing peptides corresponding to those membrane proteins were bound to E2 protein specifically as determined by neutralization of binding assay. Since it is well known that HCV can infect T cells as well as hepatocytes, we examined to see if E2 protein can bind to CCR7, a member of G-protein coupled receptor family expressed on T cells, using CCR7 transfected cells. Human CCR7 cDNA was cloned into pcDNA3.1(-) vector and transfected into human embryonic kidney cell, 293T, and expressed on the surface of the cell as shown by flow cytometer. Binding assay of E2 protein using CCR7 transfected cells indicated that E2 protein bound to CCR7 by dose-dependent mode, giving rise to the possibility that CCR7 might be a putative cellular receptor for HCV.

Key words – HCV, E2 protein, phage library, CCR7

서 론

C형 간염 바이러스 (HCV)는 flaviviridae과에 속하는 9.5

kb의 양성가닥 (positive strand) RNA 바이러스이다 [21]. 바이러스 게놈으로부터 발현된 polyprotein은 바이러스와 숙주세포의 signal peptidase, protease에 의해 core protein, 외피 당단백질 (glycoprotein)인 E1과 E2, helicase, polymerase 등의 기능을 보이는 비구조 단백질 (non-structural protein, NS2, NS3, NS4A, 4B, NS 5A, 5B)등으로 절

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-890-6724, Fax : 051-895-1864
E-mail : miccih@ijnc.inje.ac.kr

단된다[13].

E1과 E2 단백질은 N-linked glycosylation이 심하며 또한 내형질 세망 (endoplasmic reticulum, ER)막에 발현되어 있어서 ER내로 budding하는 HCV의 외피를 형성한다. 대부분의 바이러스처럼 HCV도 외피 단백질인 E1과 E2를 매개로 하여 숙주세포막에 부착하여 세포 내로 침투할 것으로 추정되고 있으며, 다음의 보고들이 이러한 주장을 뒷받침하고 있다[7]. 첫째, 수용성 E2 단백질은 인간 림프종 세포나 간암 세포주에 높은 친화도로 결합하지만 non-permissible cell line에 대해서는 결합하지 않고, 둘째, E2에 대한 단세포군 항체 (mAb)는 간세포에 대한 E2 단백질의 결합을 방해하며, 셋째, HCV에 감염된 침팬지의 혈청이 T 세포주인 MOLT-4세포에 E2 단백질이 결합하는 것을 방해한다.

현재까지 알려진 HCV의 세포 수용체들로는 인간 T 림프종 세포주인 A2R 세포의 cDNA library를 이용하여 밝혀진 CD81 [19]과 low-density 혹은 very low-density lipoprotein (LDL, VLDL) 등의 수용체인 LDLR 등이 알려져 있다 [1,16]. 이외에도 최근에는 scavenger receptor family인 scavenger receptor class B type I (SR-BI)과 liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing integrin (L-SIGN, CD 209L)등이 HCV 수용체로 제시되고 있다[8,12]. 그러나 HCV는 간세포뿐만 아니라 B 세포, T 세포, 단핵구(monocyte)등 면역세포와 이들에게서 유래된 세포주에도 감염을 일으킬 수 있으므로[3,10,24], 위에서 언급한 수용체 이외에도 더 많이 존재할 가능성이 있다.

또한 E2 단백질은 세포질내 존재하면서 여러 가지 신호 전달체계에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 내형질 세망 내에서 완성되는 glycosylated form의 E2 단백질과는 별도로 세포질 내에서 발현되는 unglycosylated E2 단백질은 double-stranded RNA activated protein kinase (PKR)와 결합하여 이 효소의 기능을 억제하므로 인터페론의 항바이러스 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다 [18]. 따라서 E2 단백질과 결합하는 세포수용체나 세포질내 단백질을 규명하는 것은 HCV의 병인기전을 밝히는 데 중요한 단서를 제공할 것이다.

본 실험에서는 표적단백질에 결합하는 단백질 domain을 검색하는데 많이 사용되고 있는 phage display 기법을 이용하여 간세포 cDNA library를 phage 표면에 발현시킨

phage library를 이용하여 HCV의 E2 단백질에 결합하는 세포단백질을 검색하였다. 또한 Echovirus 22에 대한 세포 수용체 integrin β 1 chain과 matrix metalloproteinase 9를 확인하는데 이용되어 수용체연구에 사용가능성이 제기된 peptide library [20]를 통해 E2 단백질에 결합하는 peptide를 검색하였다. Peptide의 경우 SwissProt 아미노산 데이터베이스를 검색하여 연관된 세포단백질을 결정하였다. E2 단백질에 결합이 예상되는 세포단백질 중에서 세포표면에 발현되는 CCR7을 클로닝하여 동물세포에서 발현시킨 다음, E2 결합반응을 시행한 결과 CCR7이 E2 결합에 관여하고 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

HCV E2 단백질

E2 단백질은 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포주에서 발현시켜 정제한 E2 단백질을 Chiron사(CA, USA)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 본 실험을 통해 사용한 E2 단백질은 native form을 형성하는 단백질이다[19].

Gene 8-based phagemid 벡터(pG8)의 제작

Filamentous phage의 표면단백질인 pVIII에 융합된 형태로 단백질을 발현하는 pG8SAET 벡터에 모든 cDNA가 in-frame으로 발현되도록 클로닝 부위를 변형시켰다(Fig. 1). 클로닝 부위의 *Nco* I 과 *Sna* BI을 각각 *Bgl* II로 바꾸기 위해 *Bgl* II 인식부위를 포함하고 nucleotide가 한 개씩 혹은 두 개씩 추가되어 frame shift된 primer를 제작하였다. 먼저 pG8SAET 벡터 DNA 0.1 μ g, 서로 다른 9종류의 sense, anti-sense primer 조합을 각각 10 pM씩 사용하고 premixTop (Bioneer, Korea) PCR kit를 이용하여 94 $^{\circ}$ C-5분; 94 $^{\circ}$ C-30초, 55 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-1분씩 35 cycle; 72 $^{\circ}$ C-10분의 조건으로 PCR을 시행하였다. Agarose 겔에서 전기영동하

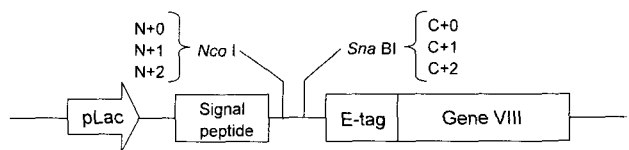


Fig. 1. Schematic diagram of pG8SAET vector with cloning sites.

여 증폭된 벡터 크기를 확인한 후 gel elution (Qiagen gel elution kit, USA)을 시행하였다.

정제된 벡터 DNA를 *Bgl*II로 절단하고 T4-DNA ligase로 ligation시켜 *E.coli* XL1-Blue에 transformation시켰다. Miniprep으로 회수한 각 벡터 DNA의 클로닝 부위는 염기서열 결정을 통해 확인하였다. 벡터를 *Bgl* II로 절단하고 alkaline phosphatase (CIAP, 1 unit)를 처리하여 간세포 cDNA library를 만드는 template 벡터로 사용하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

[N+0: 5'-GCTAGATCTCCCGGTGCGCCGGTGCCG-3', N+1: 5'-GCTAGATCTcCCCGGTGCGCCGGTGCCG-3', N+2: 5'-GCTAGATCTccCCCGGTGCGCCGGTGCCG-3', C+0: 5'-GCTAGATCTTCATCGTGTGCGCAGCAT-3', C+1: 5'-GCTAGATCTgTCATCGTGTGCGCAGCAT-3', C+2: 5'-GCTAGATCTggTCATCGTGTGCGCAGCAT-3', 이탤릭체: *Bgl* II site]

pG8-cDNA library 제작

간세포 cDNA library는 human fetal liver matchmaker cDNA library (Clontech, USA)로부터 얻었다. *Bgl*II site에 클로닝되어 있는 cDNA library를 *Bgl*II로 절단하고 전기영동하여 0.4 kb이하 부위와 그 이상 부위를 각각 구별하여 DNA를 용출하였다. 0.4 kb이상의 DNA는 *Sau* 3AI로 부분 절단하여 크기를 0.2-0.4 kb로 조절하였다.

CIAP가 처리된 9종류의 pG8 벡터 DNA (400 ng) 각각에 *Bgl*II/*Sau* 3AI로 절단된 간세포 cDNA (1 µg)를 4°C에서 16시간동안 ligation시켰다. 에탄올로 DNA를 침전시키고 10 µl의 증류수에 녹인 후 *E.coli* XL1-Blue에 electroporator (Gene Pulser II, BioRad, USA)를 사용하여 transformation하였다. 균에 SOC 배지 [SB배지 (30g of trypton, 20g of yeast extract, 10g of MOPS per liter, pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0.2% Glucose]를 3 ml 첨가하고, 37°C에서 한 시간 동안 진탕배양한 다음, ampicillin (50 µg/ml)을 포함하는 SB 배지(SB-amp) 10 ml을 첨가하였다. 다시 한 시간 동안 37°C에서 진탕배양한 뒤, helper phage M13KO7 (10¹² plaque forming unit, pfu)을 첨가하고, 2시간 동안 배양한 후 원침시켰다. Kanamycin (70 µg/ml)이 첨가된 SB 배지 (SB-kan) 100 ml로 원침된 세포를 부유시켜, 37°C에서 16시간 동안 진탕배양하여

phage rescue를 시행하였다. 배양액을 4,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 다음, phage를 포함하는 상청액을 수집함으로써 간세포 cDNA가 발현된 phage library를 최종 확보하였다.

E2 단백질에 대한 phage library의 panning

1) Biopanning

12-mer peptide library (Clontech, USA)와 cDNA phage library를 panning에 사용하였다. 96 well ELISA plate (Immulon type IV, Dynatech, USA)에 E2 단백질을 1 µg/ml의 농도로 4°C에서 16시간동안 부착시키고, 10% FBS/TBS로 37°C에서 1시간동안 blocking하였다. 그동안 10% FBS가 부착된 well에서 2시간 반응시킨 phage library 혹은 phage 상청액 (negative panning)을 회수하여 E2 단백질이 부착된 well에 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다 (positive panning). Phage 용액을 제거하고 0.05% Tween 20/TBS로 5회에 걸쳐 well을 세척하였다. 세척회수는 panning이 진행될수록 증가시켜 2차 panning 때는 10회, 3차 panning 때는 20회, 4차 panning 때는 40회 시행하였으며, 이 후의 panning에서는 40회 세척을 유지하였다. 세척 후 50 µl의 trypsin 용액 (10 mg/ml)을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 E2 단백질에 결합된 phage를 용출하였다.

2) Phage 증폭

용출된 phage를 OD₆₀₀=0.5로 배양된 *E.coli* ER2537 2 ml에 첨가한 후 실온에서 30분간 정치시켜 phage 감염을 유도하였다. SB-amp 배지를 6 ml 첨가하고 37°C에서 1시간 진탕배양하였다. 배양 후 1×10¹² VCSM13 helper phage를 배양액에 첨가한 후 100 ml SB-amp 배지를 첨가하여 37°C에서 30분간 진탕배양하였다. Kanamycin을 최종 70 µg/ml이 되게 첨가한 다음 16시간 진탕 배양하였다. 배양액을 6,000×g, 4°C에서 15분간 원침하였다. 상청액에 PEG-8000을 최종 4%(w/v), NaCl을 최종 3%(w/v)가 되게 첨가한 다음 37°C에서 5분간 용해시켰다. 상청액을 얼음속에 30분간 정치한 후 10,000×g에서 20분간 원침하였다. 1% BSA/TBS 용액 2 ml로 pellet을 녹인 후 0.45 µm 주사기 filter로 여과시켜 다음 번 panning에 사용하였다. 최종 panning단계에서 용출된 phage를 ER2537에 감염시킨 다음 LB/amp plate에 접종하여 콜로니 형태로 확보하였다.

E2-binder의 검색

Microtiter plate의 각 well에 SB-amp 배지 100 μ l씩 분주하고, 최종 panning 후에 확보된 phagemid 집락을 멸균된 이쑤시개를 이용하여 접종하고, 37°C에서 125 rpm으로 천천히 진탕시키면서 12시간 배양하였다. Helper phage인 M13KO7를 각 well에 10^8 pfu (200 μ l)되게 새로운 microtiter plate에 분주하였다. 배양된 균액 20 μ l씩을 helper phage가 들어있는 plate의 각 well로 옮긴 후, 천천히 진탕하면서 2시간 동안 배양한 다음, plate를 800 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 상청액을 모두 버리고, SB-amp 배지를 각 well당 200 μ l씩 첨가하여 125 rpm으로 진탕시켰다. 16시간 동안 37°C에서 배양한 다음, plate를 800 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. Phage가 들어 있는 상청액 50 μ l만을 이용하여 E2 단백질에 대한 ELISA를 시행하였다.

Microtiter plate의 각 well에 1 μ g/ml의 E2 단백질을 panning 단계에서 사용한 동일한 조건으로 부착시키고 blocking하였다. Microtiter plate에서 회수한 phage 상청액 50 μ l를 각 well에 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 우선 증류수로 1회 세척하고, wash buffer [50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20]로 5회 이상 세척하였다. 1% BSA/PBS에 1:1,000으로 희석한 HRP conjugated sheep anti-M13 phage antibody (Pharmacia, USA)를 각 well에 50 μ l씩 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. Plate를 wash buffer로 5회 이상 세척하고, 50 μ l의 O-phenylenediamine을 함유하는 기질용액을 각 well에 분주하여 충분히 발색을 시킨 뒤, 50 μ l의 0.5 N H₂SO₄ 용액을 첨가하여 발색을 정지하였다. 이후 TiterTeck의 Multiscan Plus P ELISA reader로 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 양성인 클론을 선택하였다.

E2 단백질 결합중화 실험

선택된 phage 클론들이 E2 단백질에 특이적으로 결합하는지를 조사하기 위해 competitive ELISA를 시행하였다. 위에서 언급한 동일한 조건으로 ELISA plate에 E2 단백질을 부착시키고 blocking하였다. 10 μ g/ml의 E2 단백질과 양성반응을 보인 peptide phage (5×10^{10})를 4°C에서 1시간 반응시킨 다음, E2 단백질이 부착된 well에 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 이 후 위와 동일한 조건으로 항체를 반응시키고 발색반응을 유도하였다.

양성 클론의 cDNA 염기서열 결정

ELISA에서 양성으로 확인되고, E2 단백질에 특이적으로 결합하는 phagemid 클론을 골라서 염기서열을 결정하였다. Sequencing primer로는 벡터 염기서열인 5'-CACGACGAAAACGACGG-3'를 이용하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석하였다.

293T 세포에서의 CCR7 발현

사람의 말초혈액 50 ml를 anti-CD3 항체가 포함된 cocktail mixture (SpinSep, Stem cell Technology, USA)와 반응시킨 후 Ficoll-hypaque (Pharmacia, USA)을 이용하여 T 세포를 분리하였다. 5×10^6 T 세포를 5 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA)이 첨가된 10% FBS/RPMI 배지에서 2일간 배양한 후 total RNA를 RNeasy column (Qiagen, USA)을 이용하여 정제하였다. 3 μ g의 total RNA와 200 unit의 역전사효소(SuperScript II, Stratagene, USA)를 42°C에서 1시간 반응시켜 first strand cDNA를 제작하였다. 사람 CCR7의 ORF는 forward primer: 5'-ACTGAATTCATGGACCTGGGGAAA-3', reverse primer: 5'-ACTAAGCTTCTATGGGGAGAAGGTGG-3'를 이용한 PCR 반응으로 증폭시켰다. CCR 7 유전자를 *Eco* RI과 *Hin* dIII로 처리하여 동일 효소로 처리된 pcDNA 3.1(-) 벡터에 클로닝하였다. CCR7 유전자가 확인된 클론의 DNA를 대량으로 정제하여 transfection에 사용하였다. 먼저 10 μ g의 plasmid와 250 mM calcium chloride를 혼합한 후 동량의 2x HEPES (pH 7.0)와 실온에서 30분간 반응시킨 혼합액을 이용하여 인간 태아 신장세포인 293T 세포에 transfection하였다. 2일 후에 transfection된 세포들을 회수하여 anti-human CCR7 항체 (R&D system, USA)와 phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse IgG (Becton Dickinson, USA)를 각각 일차와 이차 항체로 반응시키고, flow cytometer로 관찰한 다음, Cell Quest 프로그램(Becton Dickinson, USA)을 이용하여 CCR7 발현 여부를 분석하였다. 위 반응은 모두 4°C에서 30분간씩 시행하였으며, 3% FBS/PBS buffer로 세포들을 세척하였다.

CCR7과 E2 단백질과의 결합

CCR7이 발현된 5×10^5 의 293T 세포와 동일한 수의 mock transfection된 대조군 세포에 각각 4.5, 1.5, 0.5 μ g의 E2 단백질을 첨가하여 반응시켰다. 부착된 E2 단백질은

anti-E2 단세포군 항체(Dubuisson J, Institut de Lille로부터 분양받음)와 PE conjugated anti-mouse IgG를 이용하여 flow cytometer로 확인하였으며, 반응은 위에서 언급한 동일한 조건으로 실시하였다.

결 과

cDNA library의 제작

Filamentous phage 벡터(pG8SAET)에 cDNA가 in-frame으로 클로닝될 수 있도록 변형된 9종류의 pG8 벡터를 제작하였고, 클로닝 부위의 염기서열을 확인한 후 library제작에 사용하였다. 간세포 cDNA library는 human fetal liver matchmaker cDNA library를 *Bgl* II로 절단하여 얻었다. pG8SAET를 이용하여 phage 표면에 단백질을 발현시킬 경우 평균 발현되는 단백질의 분자량은 11 kDa이므로 0.4 kb이상의 cDNA는 별도로 *Sau* 3AI를 처리하여 크기가 0.2-0.4 kb되게 만들었다. 9종류의 phagemid 벡터에 cDNA library를 ligation한 후 electroporation으로 transformation을 시행하였다. 최종 8.8×10^5 cfu의 cDNA phage library를 얻었으며, library의 효율을 알아보기 위해 insert를 확인한 결과 약 95%의 library가 cDNA insert를 가지고 있었다.

E2 단백질에 대한 biopanning 및 E2-binder의 검색

E2 단백질에 결합하는 간세포 cDNA와 peptide를 확인하기 위하여 cDNA phage library와 12-mer peptide library를 사용하였다. 각 panning의 회수결정은 panning에 사용한 input phage와 E2 단백질에 결합된 뒤 용출되는 output phage의 비율(O/I ratio)이 정점에 이르는 단계와 각 단계에서 회수한 phage로 E2 단백질에 대한 ELISA를 실시하여 더 이상의 signal 증가가 없는 단계까지로 하였다. Peptide library는 2차 panning 단계에서부터 O/I ratio가 증가하여 4차 단계에서 최대 ratio를 보였으며, cDNA phage library는 7차에서 O/I ratio가 최대이었다(Table 1). E2 단백질에 결합하는 phage의 양을 ELISA로 확인한 결과, panning 단계가 진행될수록 증가하였으며 O/I ratio 변화와 유사한 양상을 보였다(Fig. 2A). 최종적으로 HCV E2 binder를 검색하기 위해 4차와 7차 단계에서 회수한 각각의 peptide 혹은 cDNA phage clone을 이용하여 E2 단

Table 1. Enrichment of cDNA or peptide phages binding to E2 protein of HCV throughout the panning steps

Panning	Phage		O/I ratio [#] ($\times 10^{-8}$)
	Input	Output	
cDNA phage library			
1	2.2×10^{12}	8.0×10^7	3600
2	3.8×10^{11}	7.3×10^5	190
3	1.1×10^{12}	2.5×10^4	2.2
4	1.1×10^{13}	7.8×10^5	6.8
5	1.8×10^{12}	8.9×10^4	4.9
6	2.4×10^{12}	1.1×10^6	49
7	1.7×10^{12}	2.0×10^6	110
Peptide library			
1	5.6×10^{12}	2.3×10^7	410
2	7.2×10^{12}	4.1×10^5	5.6
3	1.4×10^{13}	8.2×10^6	58
4	2.0×10^{13}	2.7×10^7	130

[#]O/I ratio=(Number of eluted phages (output phage))/(Number of phages applied into reaction (input phage))

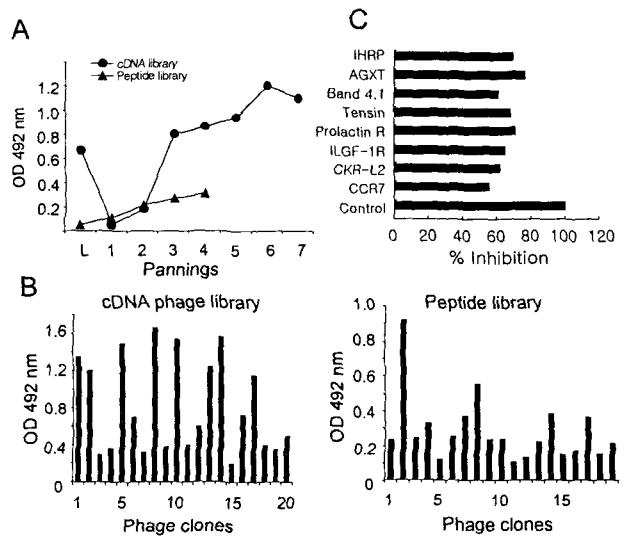


Fig. 2. Panning and screening of cDNA or peptide library. (A) ELISA of E2 protein using cDNA or peptide phages rescued and amplified from each panning step. (B) ELISA of E2 protein using phages expressing cDNAs or peptides recovered from 7th or 4th panning against E2 protein. (C) Neutralization of binding assay. 10 µg/ml E2 protein was used as competitor to the binding of cDNA or peptide phages against immobilized E2 protein. % inhibition={(ELISA signal from phages with competitor)/(ELISA signal from phages without competitor)}*100

백질에 대한 ELISA를 실시하여, 각각 7개와 8개의 반응성이 높은 클론들을 확보하였다(Fig. 2B). 이들 클론의 특이도를 검증하기 위해 10 µg/ml의 수용성 E2 단백질을 competitor로 하여 phage와 함께 혼합한 후 E2 단백질에 대해 ELISA를 시행한 결과, 대부분의 클론들이 20-40%씩 결합이 방해되었다(Fig. 2C).

염기서열 결정

벡터에 특이적인 primer를 이용하여 각 클론의 염기서열을 결정한 후 NCBI의 BLAST program을 이용하여 유사한 유전자들을 분석하였다. Table 2에서와 같이 peptide library로부터는 세포막 단백질인 insulin-like growth factor-1 receptor, prolactin receptor, 그리고 신호전달과정에 관여하는 CKR-L2와 CCR7 단백질 등이 확인되었다. cDNA phage library로부터는 신호전달과정과 actin filament 이동과 재구성에 관여하는 tensin과 membrane protein band 4.1이 클로닝되었으며, 간세포대사에 관여하는 단백질 등이 확인되었다.

CCR7의 동물세포에서의 발현 및 E2 단백질 결합

주로 T 세포에서 발현되는 CCR7 단백질 유전자를 클로닝하기 위하여 활성화된 인간 T 림프구로부터 정제된 total RNA를 이용하였다. RT-PCR 반응으로 1,137 bp의 CCR7 전체 유전자를 증폭시켰고, 이를 동물세포 발현 벡터에 클로닝하였다. CCR7 유전자가 확인된 재조합 plasmid를 calcium phosphate 법으로 293T 세포에 transfection시킨 다음, 2일 후 CCR7의 발현을 조사하였다. Mock trans-

fection된 대조군과 비교하여 70% 이상의 세포에서 CCR7이 세포표면에 발현되고 있었다(Fig. 3A).

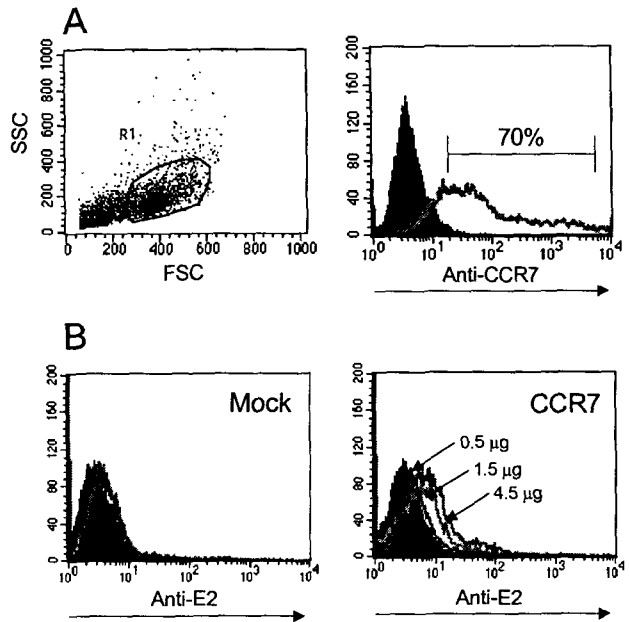


Fig. 3. Flow cytometry of CCR7-expressing 293T cells. (A) 293T cells were transfected with mock or CCR7 expressing pcDNA 3.1(-) vector. Transfected cells were stained with anti-human CCR7 and PE conjugated anti-mouse IgG. Solid and open peak represent mock and CCR7 expressing cells, respectively. (B) Binding of E2 protein to transfected cells. Indicated amounts of E2 protein were subjected to bind to mock or CCR7 expressing cells. Bound E2 protein onto cells were detected by anti-E2 mAb and PE conjugated anti-mouse IgG using flow cytometer.

Table 2. Determination of genes expressed on cDNA or peptide library following final screening

Library		Homology [#]
cDNA	Tensin	
	Membrane band 4.1	
	Alanine-Glyoxylate aminotransferase (AGXT)	
	Inter-alpha trypsin inhibitor family chain-related protein (IHRP)	
Peptide	CCR7 (1-62; 117-130; 194-228; 287-305)	297-304
	CKR-L2 (1-103; 161-174; 238-276; 323-352)	38- 47
	Insulin-like growth factor-1 receptor (1-935)	466-475
	Prolactin receptor (259-622)	402-411

[#]The location of amino acid sequence in the corresponding protein showing the homology to peptide sequence from peptide phage. ^{*}Numbers in the parenthesis indicate the location of amino acid sequence representing an extracellular domain of corresponding protein predicted by TMHMM server v 2.0 program.

대조군 세포와 CCR7 유전자가 transfection된 293T 세포에 대해 E2 단백질 결합여부를 확인하였다. E2 단백질양을 titration하여 반응시켰을 경우 dose-dependent mode로 CCR7 발현세포에 결합하였다. 즉 4.5 µg과 1.5 µg의 E2 단백질을 반응시켰을 경우, 각각 32%, 20%의 CCR7이 transfection된 세포에 결합하였지만 0.5 µg의 단백질을 사용하였을 경우 5.7 %의 세포에만 결합하였다(Fig. 3.B).

고 찰

바이러스의 숙주세포감염은 바이러스입자의 표면단백질과 세포막의 수용체사이의 일차적인 결합이 선행이 되고, 일부의 바이러스는 보조 수용체와 이차적인 결합이 이루어져 세포내로 이동한다[6]. 수용체의 존재여부는 바이러스가 감염을 일으킬 수 있는 조직의 범위를 규정하며 (tropism), 바이러스 감염의 초기단계를 이해할 수 있는 단서를 제공하기 때문에 수용체 규명은 바이러스 병인성 연구의 중요과제가 되고 있다.

기존에 알려진 HCV의 수용체중에서 CD81은 E2 단백질과의 특이적인 결합에도 불구하고 광범위한 조직에서 발견되고 있으며, genotype 1b에서 유래한 E2 단백질과만 결합하여서 HCV의 tropism과 수용체의 일반적인 현상을 설명하는데 한계가 있다 [9]. 또한 LDL 수용체(LDL-R)는 HCV 바이러스입자의 세포내 침입 (internalization)에 관여하지만 E2 단백질과 직접적으로 결합하고 있지는 않다 [1]. 또 다른 수용체인 SR-BI는 간세포와 steroidogenic tissue에서 많이 발견되며, genotype 1a 혹은 1b등 여러 genotype의 E2 단백질과 결합하고 있어서 HCV의 실질적인 수용체일 가능성이 높으나, 실제 바이러스입자와 결합한다는 보고는 없다[22]. 최근에 간조직과 림프절에서 많이 발견되고 있는 L-SIGN (CD209L)과 수상돌기세포 (dendritic cell)에서 발견되는 DC-SIGN이 HCV 입자의 결합에 관여하는 것으로 보고되었다 [8]. 이상의 보고들과 HCV가 감염을 일으킬 수 있는 세포들의 다양성을 고려할 때 이들 이외에 다른 수용체가 존재할 가능성이 높다.

본 연구에서는 cDNA library의 발현 vehicle로 filamentous phagemid인 pG8SAET 벡터를 사용하였다. Phage display 기법은 phage 표면에 발현된 단백질과 이를 coding 하는 유전자가 한 unit로 phage를 구성하고 있어서 원하는

phenotype을 보이는 phage를 선택함과 동시에 유전자를 확보하게 되며, biopanning 과정을 통해 한번에 10^7 이상의 library를 검색하는 high throughput screening이 가능하고, 동시에 panning과정을 반복할수록 특이도가 높은 phage를 증폭시킬 수 있는 장점 때문에 antibody library나 peptide library의 제작에 많이 이용되어 왔다. 최근에는 이 기법을 이용하여 사람의 CD99을 phage 표면에 발현시켜 수용체-ligand 연구에 사용하는 방법이 소개되었으며 [27], osteoblast의 cDNA library를 phage 표면에 발현시켜 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)에 결합하는 TGF-beta receptor-interacting protein (TRIP-1)을 클로닝한 내용[23]과 마우스 간세포주인 MMH E14의 cDNA phage library를 이용하여 전사요소인 HNF1 alpha의 promoter에 결합하는 단백질을 확인한 사실들이 보고되었다 [4].

본 실험에서는 간세포 cDNA phage library와 peptide library를 검색하여 E2 단백질에 결합하는 단백질들을 검색하였다. cDNA phage library의 경우 phage 표면에 발현시키기 위해 cDNA의 크기를 0.2-0.4 kb로 조절하였음에도 불구하고 주로 간세포질내 단백질이 클로닝되었다. 이는 친수성과 소수성 단백질들로 구성된 세포막 단백질들보다는 친수성 단백질로 주로 구성된 세포질 내 단백질들이 phage 외피 형성에 이점을 가지고 있어서 이들 단백질이 발현된 phage들이 주로 검색되었을 가능성이 있다. 각각 oxalate 대사와 acute phase protein으로 혈중으로 분비되어 대식세포의 탐식작용에 관여하는 alanine-glyoxylate aminotransferase (AGXT)와 inter-alpha trypsin inhibitor family chain-related protein (IHRP)등 간세포질내 단백질이 검색되었다. 또한 tensin과 membrane protein band 4.1은 세포의 신호전달과정과 세포내 골격구조물(cytoskeleton)의 재구성 등에 관여하는 것으로 알려져 있어서 HCV E2 단백질의 또 다른 간세포내 기능을 시사해 주고 있다 [5,11].

Peptide library의 경우 E2 단백질에 결합하는 부위가 세포막 단백질의 선형구조(linear structure)와 일치하는 경우 Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)에서 제공하는 Fasta3 프로그램을 이용하여 유사한 단백질을 검색할 수 있으나 수용체의 3차원 구조(conformational structure)를 모방하는 경우에는 데이터 베이스에서 검색이 불가능하다. 본 실험에서는 7개의 peptide 클론중에서 4개의 클론이 세포막 단백질의 서열과 일치하고 있었다. 또한 이들의 이차

구조를 분석하는 TMHMM server v 2.0 프로그램으로 분석한 결과, E2 단백질에 결합하는 peptide는 이들 세포막 단백질의 세포막 외부(extracellular domain)의 서열과 일치하고 있어서 이들이 E2 단백질에 결합하는 세포막 단백질임을 간접적으로 확인할 수 있었다(Table 2).

이들 중에서 prolactin receptor은 주로 HCV 감염보고가 없는 유선조직에서, insulin-like growth factor-1 receptor는 거의 모든 조직에서 발견되는 양상을 보여 HCV의 특이적 수용체일 가능성이 희박하다. 따라서 면역세포에 대한 HCV의 감염을 고려해 볼 때 주로 T 세포에서 발견되는 CCR7을 표적으로 하여 수용체확인 여부를 진행하는 것이 합리적으로 생각되었다.

Chemokine 수용체인 CCR7은 7-transmembrane 부위를 갖고 있는 G-protein coupled receptor (GPCR)에 속한다. Thymocyte, NK 세포, B 세포, memory T 세포, 수상돌기

세포 등 면역관련세포 뿐만 아니라 유방암, nonsmall cell 폐암, 위암세포주 등 비립프계 세포에서도 발견되고 있으나 [14,17,25], 간세포에서의 발현은 보고되어 있지 않다. 주로 세포의 이동(homing, trafficking)에 관여하는 것으로 알려져 있는 GPCR [2] 단백질은 빛, 냄새, 맛과 같은 감각인식과정이나 신경전달물질 혹은 호르몬의 신호전달과정에 중요한 역할을 하고 있을 뿐만 아니라[26] HIV-1의 세포침입에 중요한 보조 수용체 (coreceptor)로도 작용하고 있다 [15]. 이 단백질은 구조상 7개의 세포막내 소수성 부위를 지니고 있어서 바이러스-수용체 복합체를 형성한 후 세포내로 internalization될 가능성은 매우 낮지만 actin filament를 재구성하는 데 필요한 신호전달을 매개하므로 다른 수용체 혹은 보조 수용체의 재구성을 촉진시켜 바이러스의 세포내 침입을 가능하게 하는 것으로 알려져 있다[28].

마우스, 원숭이, 사람의 CCR7 아미노산 서열을 비교하

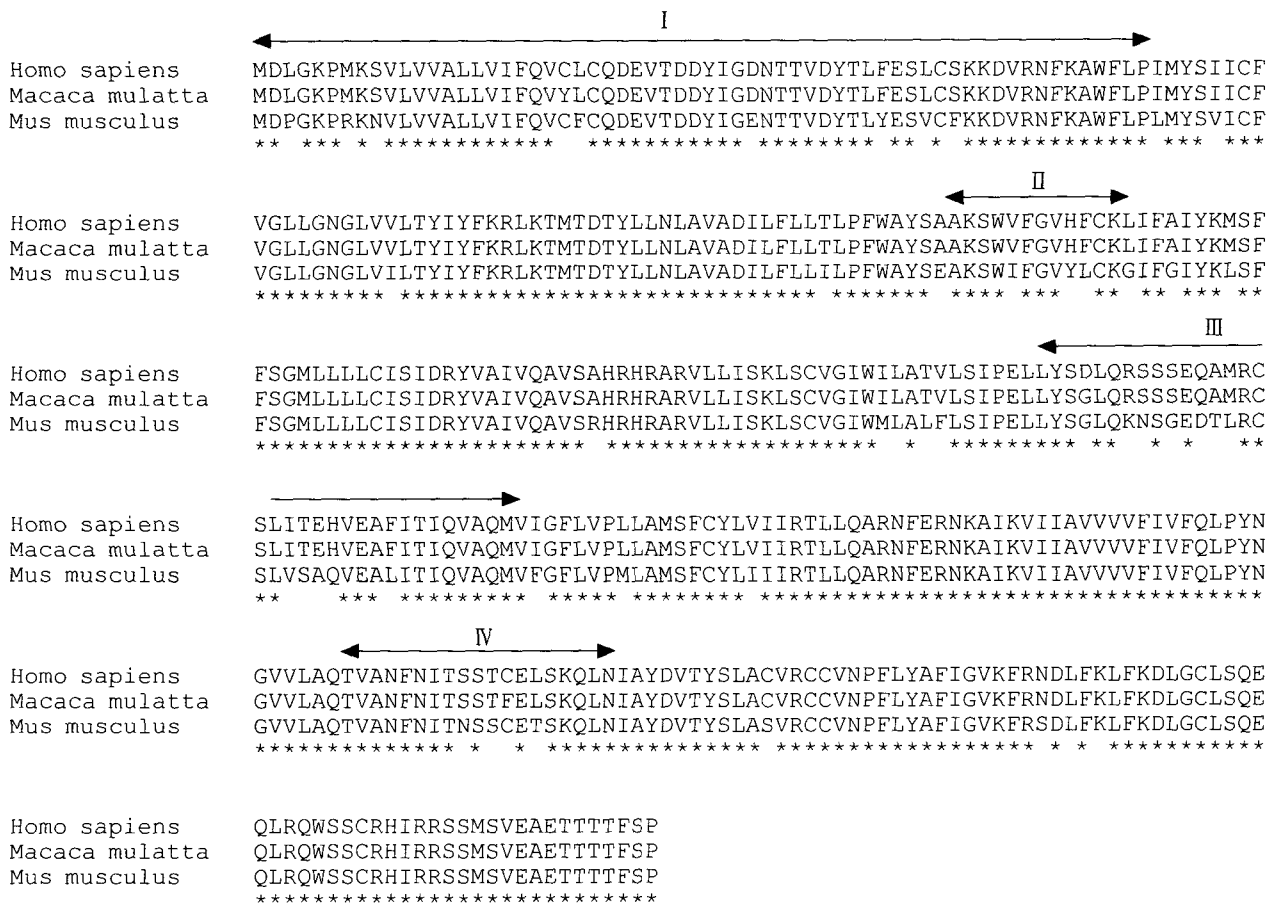


Fig. 4. Comparison of amino acid sequences of CCR7 from different species. Numbered lines indicate the extracellular domains of CCR7 and asterisks show the conserved amino acid sequences between the species.

였을 때, 사람과 원숭이 사이에는 99%의 유사도를, 사람과 마우스 사이에는 86%의 유사도를 보였으며(Fig. 4), 마우스 CCR7의 3번째 extracellular loop에서 종(species)사이의 변이도가 집중적으로 나타났다. 물론 CCR7의 이 부위가 E2 결합에 결정적인지는 앞으로의 실험을 통해 밝혀져야 할 과제라고 생각된다. 그러나 이와같은 구조상의 특징은 HCV가 사람이나 원숭이 이외의 숙주에 대해서는 감염을 일으키지 않는 조직친화도의 특징을 간접적으로 설명하는 것으로 생각된다. 따라서 CCR7 발현 phage의 E2 단백질 결합, E2 단백질에 의한 CCR7 phage의 특이적인 결합방해, CCR7 발현세포에서 dose-dependent 양상의 E2 단백질 결합 등의 결과를 통해 CCR7이 HCV의 또 다른 세포수용체일 가능성을 추정해 볼 수 있다.

앞으로의 실험에서 E2 단백질에 대한 blocking antibody를 개발하고 이를 이용하여 CCR7에 대한 E2 단백질의 결합이 중화됨을 증명하고, antisense RNA에 의해 CCR7 단백질의 발현이 차단된 T 세포나 CCR7 발현세포주에서 E2 결합이 소실됨을 밝히고, 실제 환자혈청내에 존재하는 바이러스입자가 CCR7 발현세포에 직접 결합함을 확인함으로써 CCR7이 직접적인 HCV 세포막 수용체임을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 실험에서는 C형 간염바이러스 (HCV)의 외피 단백질인 E2 당단백질에 결합하는 세포단백질들을 클로닝하기 위해 간세포 cDNA를 phage 표면에 발현시킨 phage library를 제작하였고, 12-mer peptide library와 함께 E2 단백질에 대해 panning을 실시하였다. 검색결과 세포내 신호전달과 cytoskeleton 구성에 관여하는 tensin, membrane protein band 4.1 등 세포질내 단백질과 CCR7, CKR-L2, insulin-like growth factor-1 receptor 등 세포막 단백질 등이 확인되었다. 이들 단백질들을 발현하는 phage들은 수용성 E2 단백질을 이용한 결합중화반응 결과 E2 단백질에 특이적으로 결합함이 확인되었다. 사람 T 세포에서 주로 발현되는 CCR7 유전자를 PHA로 활성화된 사람 T 세포의 total RNA를 이용하여 증폭하고 클로닝하였다. 293T 세포에 transfection시켜 단백질 발현양상을 flow cytometer로 분석하여 70% 이상의 세포들이 CCR7을 발현하고 있음을

관찰하였다. 수용성 E2 단백질을 CCR7이 transfection된 세포와 mock transfection된 대조군 세포에 각각 반응시킨 결과 dose-dependent 양상으로 CCR7에 결합하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호: HMP-00-B-20200-0008)

참 고 문 헌

1. Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight and Q. X. Zhang. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12766-12771.
2. Bardi, G., M. Lipp, M. Baggiolini and P. Loetscher. 2001. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulated with ELC, but not with SLC. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3291-3297.
3. Bertolini, L., S. Lacovacci, A. Ponzetto, G. Gorini, M. Battaglia and G. Carioni. 1993. The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Research in Virol.* **144**, 281-285.
4. Cicchini, C., H. Ansuini, L. Amicone, T. Alonzi, A. Nicosia, R. Cortese, M. Tripodi and A. Luzzago. 2002. Searching for DNA-protein interactions by lambda phage display. *J. Mol. Biol.* **322**, 697-706.
5. Correas, I. 1991. Characterization of isoforms of protein 4.1 present in the nucleus. *Biochem. J.* **279**, 581-585.
6. De Beeck, A. O. and J. Dubuisson. 2003. Another putative receptor for hepatitis C virus. *Hepatology* **37**, 705-707.
7. Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Carbezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter and R. H. Purcell. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15394-15399.
8. Gardner, J. P., R. J. Durso, R. R. Arrigale, G. P. Donovan, P. J. Maddon, T. Dragic and W. C. Olson. 2003. L-SIGN (CD209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

- 100, 4498-4503.
9. Hadlock, K. G., R. E. Lanford, S. Perkins, J. Rowe, Q. Yang, S. Levy, P. Pileri, S. Abrignani and S. K. Fong. 2000. Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J. Virol.* **74**, 10407-10416.
 10. Ikeda, M., N. Kato, T. Mizutani, K. Sugiyama, K. Tanaka and K. Shimotohno. 1997. Analysis of the cell tropism of HCV by using in vitro HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. *J. of Hepatology* **27**, 445-454.
 11. Kook, S., D. H. Kim, S. R. Shim, W. Kim, J. S. Chun and W. K. Song. 2003. Caspase-dependent cleavage of tensin induces disruption of actin cytoskeleton during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 37-45.
 12. Krieger, M. 2001. Scavenger receptor class type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest* **108**, 793-797.
 13. Lindenbach, B. D and C. M. Rice. 2001. Hepatitis viruses and their replication, pp. 9911-1041. In Knipe, D. M and P. M. Howley (eds), *Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
 14. Mashino, K., N. Sadanaga, H. Yamaguchi, F. Tanaka and M. Mori. 2002. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* **92**, 2937-2941.
 15. Mirzabekov, T., N. Bannert, M. Farzan, W. Hofmann, P. Kolchinsky, L. Wu, R. Wyatt and J. Sodroski. 1999. Enhanced expression, native purification, and characterization of CCR5, a principal HIV-1 coreceptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 28745-28750.
 16. Monazahian, M., I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grefthe and R. Thomssen. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **57**, 223-229.
 17. Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56.
 18. Pavio, N., D. R. Taylor and M. C. Lai. 2003. Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelop protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *J. Virol.* **76**, 1265-1272.
 19. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi and S. Abrignani. 1998. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.
 20. Pulli, T., E. Koivunen and T. Hyypia. 1997. Cell-surface interactions of echovirus 22. *J. Biol. Chem.* **272**, 21176-21180.
 21. Reed, K. E and C. M. Rice. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **242**, 55-84.
 22. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017-5025.
 23. Sheu, T. J., E. M. Schwarz, D. A. Martinez, R. J. O'Keefe, R. N. Rosier, M. J. Zuscik and J. E. Puzas. 2003. A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 438-443.
 24. Shimizu, Y. K and H. Yoshikura. 1995. In-vitro systems for the detection of hepatitis C virus infection. *Virol hepatitis Rev.* **1**, 59-65.
 25. Takanami, I. 2003. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int. J. Cancer* **105**, 186-189.
 26. Tarasova, N., W. G. Rice and C. J. Michejda. 1999. Inhibition of G-protein coupled receptor function by disruption of transmembrane domain interactions. *J. Biol. Chem.* **274**, 34911-34915.
 27. Tayapiwatana, C and W. Kasinrek. 2002. Construction and characterization of phage-displayed leukocyte surface molecule CD99. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 336-341.
 28. Ward, S. G., K. Bacon and J. Westwick. 1998. Chemokines and T lymphocytes: More than an attraction. *Immunity* **9**, 1-11.

(Received June 9, 2003; Accepted August 16, 2003)