

## Spot Assay를 통한 Human Cytomegalovirus의 UL97 단백질 인산화 효소의 기질 특이성

백 문 창<sup>#</sup>

경북대학교 의과대학 분자의학교실

(Received July 25, 2006; Revised August 8, 2006)

### Substrate Specificity of UL97 Protein Kinase from Human Cytomegalovirus using Spot Assay

Moon-Chang Baek<sup>#</sup>

Department of Molecular Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, 101 Dongin-dong, Jung-gu, Daegu 700-422, Korea

**Abstract** — Protein kinase UL97 is an unusual protein kinase that can phosphorylate nucleoside analogs as well as protein/peptide. Previously we found a H2B-derived peptide, KESYSVYVYKV and reported that the P+5 position (K) is important. To further understand the substrate specificity at the P+5 position, we introduced spot assay system and showed that a peptide containing K residue among other amino acids at the P+5 position is the best substrate. Also other residues such as M, I, L, or G are good enough to be substrate of UL97. This result may aid the discovery of a new antiviral inhibitor.

**Keywords** □ protein kinase UL97, peptide substrate, spot assay

UL97은 바이러스 감염시 아주 중요한 역할을 하며 항바이러스제의 작용점이 된다.<sup>1,2)</sup> 이 효소는 완전히 필수적이지는 않지만 세포 배양시에 human cytomegalovirus(HCMV) 복제에 있어서는 필수적이다.<sup>3)</sup> UL97은 바이러스의 DNA 합성, 바이러스 assembly, 그리고 핵으로부터 assemble된 nucleocapsid의 egress 시에 중요한 역할을 한다는 보고들이 있다.<sup>4,5)</sup> UL97은 ganciclovir와 같은 핵산 유도체를 활성화 시킬 수 있고,<sup>1,2,6)</sup> 자가 인산화 작용이 있으며<sup>7)</sup> 단백질로써 UL44,<sup>8)</sup> histone H2B<sup>9)</sup>와 같은 단백질과 펩타이드 들을 인산화 할 수 있다. 이 효소는 바이러스 복제를 억제할 수 있는 단계에서 작용하므로 항바이러스제의 타겟이 된다. 최근에 미국의 Glaxo 회사에서 개발되어 임상 2상에 있는 maribavir<sup>10,11)</sup>는 세포배양 시에 HCMV 복제의 선택적인 억제제 이었고, 이 약은 특이적으로 UL97의 활성을 억제하였다. 이를 통해서도 UL97은 새로운 항바이러스제를 개발하는 데 주요 타겟이 됨을 증명해 주었다.

UL97은 HvUL 단백질 인산화 효소계에 속하며 여러 가지 허피스 바이러스에 의해 생성되는 단백질 인산화 효소와 서열에 있

어서 아주 유사하다.<sup>12)</sup> 이들 효소들은 전형적인 단백질 인산화 효소의 모티프를 포함하고 있으면서도 아주 변형이 아주 많이 되어 있다. 이들은 N-terminal 영역의 길이가 다양하고, 이 부분의 서열은 매우 다르다. UL97의 이 부위는 다른 것들에 비해 더 변형이 되어있고, 특이하게 아주 긴(약 300 잔기 이상) N-terminal 부위를 가지고 있다.<sup>12)</sup>

본 연구자는 UL97에 의해 인산화 되는 펩타이드 KESYSVYVYKV (S : 인산화 되는 위치)를 보고 하였다.<sup>9)</sup> 이 펩타이드는 히스톤 H2B에 존재하는 것으로써, 합성 펩타이드가 UL97에 의해 in vitro에서 인산화 됨을 보였고, 인산화 되는 Ser으로부터 C 말단 쪽으로 다섯 번째(P+5) 떨어져 있는 K가 중요함을 보고하였다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 spot assay를 통해 P+5 위치에 여러 가지 아미노산으로 치환시켜 얻어진 합성 펩타이드들을 이용하여 UL97 단백질 인산화 효소의 기질 특이성을 더 자세히 밝혀내고자 한다.

### 실험 방법

#### 세포 및 바이러스

*Spodoptera frugiperda* 9 cells(Sf9)은 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum (Atlanta Biologicals), 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml strep-

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 053-420-4948 (팩스) 053-426-4944  
(E-mail) mcbaek@knu.ac.kr

tomycin B를 포함하는 Grace's insect medium(Invitrogen)에서 배양하였다. Glutathione S-transferase(GST)-UL97을 발현시키는 baculovirus는 일반적인 방법에 따라 배양 및 이용을 하였다.<sup>13)</sup>

#### Baculovirus 발현 GST-UL97과 GST-UL97K355Q의 정제

모든 칼럼용 시약은 Amersham Bioscience에서 구입하였다. Baculovirus에 의해 발현된 GST-UL97과 GST-UL97K355Q는 전에 보고한 방법처럼 정제되었다.<sup>9)</sup> 간략히, 먼저 glutathione-Sepharose affinity 칼럼을 이용하고, 다음으로 Q-Sepharose 칼럼과 phenyl-Sepharose 칼럼을 이용하였고, 이를 Centricon-30을 이용하여 농축하고 투석을 하였다. 최종 얻어진 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 순수하게 분리되었음을 확인하였고, amino acid analysis를 통하여 단백질 농도를 결정하였다.

#### Spot assay용 synthetic peptide

Assay용 peptide paper는 Research Genetics(미국)사에서 만들었다. 각각의 펩타이드는 nanomole 양으로 안정한 hydrophilic membrane sheet의 표면에서 직접 합성되었다. 펩타이드는 전형적인 Fmoc 방식을 이용하여 합성되었다.

#### Membrane paper에서의 Protein kinase assay

합성된 펩타이드를 포함하는 종이는 에탄올에 적신 후, kinase buffer(0.2 mg/ml BSA와 100 mM NaCl 포함, ATP는 포함하지 않음)에서 하룻밤 반응을 시킨다. 50  $\mu$ M ATP를 포함하는 kinase buffer로 바꾸어주고, 45분 동안 30°C에서 반응시킨다. 다음으로 50  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP(300  $\mu$ Ci/mmol)를 포함하는 버퍼로 바꾸어주고, GST-UL97 인산화 효소(18  $\mu$ g)를 넣고 30°C, 20분간 천천히 움직이면서 반응을 시킨다. 반응 후 반응된 종이를 1 M NaCl로 10번, 물로 3번, 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 3번, 물로 3번, 마지막으로 에탄올로 2번 씻어낸다. 종이를 공기 중에서 말린다.

#### Autoradiograph 및 결과 분석

인산화 된 펩타이드를 포함한 종이는 하루 동안 X-ray 필름으로 autoradiograph를 한다. 얻어진 X-ray 필름은 densitometer를 이용하여 각 spot의 상대 강도로 표현한다.

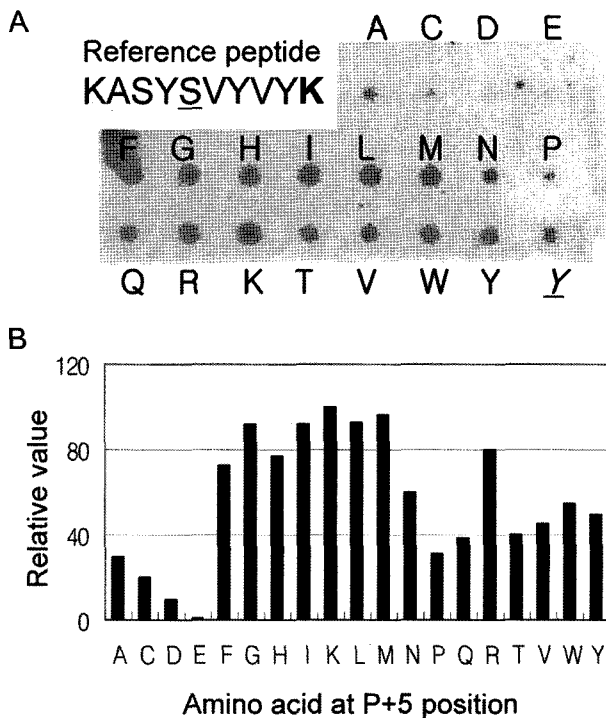
### 실험 결과 및 고찰

GST-UL97은 baculovirus를 이용하여 곤충세포에서 발현시켰고, 이를 기존에 보고 된 방법을 이용하여 순수하게 분리 정제하였다. GST-UL97을 순수하게 분리 정제하는 단계에 있어서 다른 단백질 인산화 효소의 혼입 가능성을 배제하기 위하여, GST-UL97K355Q라는 돌연변이 단백질을 이용하였고, 그 결과 순수한 GST-UL97이 분리정제 되었음을 알게 되었다.<sup>9,14)</sup> GST-UL97

은 histone H2B를 인산화 시킬 수 있었고, 인산화 된 잔기 주위로부터 합성된 펩타이드가 인산화 됨을 보고하였다.<sup>9)</sup> 합성된 펩타이드 들은 P+5 위치가 UL97에 의해 인산화 되는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보여 졌다. 따라서 본 연구에서는 P+5 위치를 다른 19개 아미노산 잔기로 치환된 19개 펩타이드를 포함하는 spot paper를 이용하여 UL97의 기질 특이성을 더 연구하고자 하였다.

기본이 되는 펩타이드는 UL97에 의해 인산화 되는 histone H2B의 잔기인 KASYSVYVYK를 이용하였다. Research and Genetics사에 의뢰하여 P+5 위치(K)를 Ser을 제외한 모든 가능한 아미노산(19개)으로 치환된 합성 펩타이드를 포함한 spot paper를 제조하였다. cellulose paper위에 nanomolar의 양으로 펩타이드를 직접 합성하는 방식으로 이 membrane sheet는 일반적인 효소 반응이나 동위원소를 이용한 방식에 이용할 수 있으며, positive reaction을 갖는 펩타이드를 chromogenic, fluorometric 또는 autoradiography 방식을 이용해서 찾을 수 있다. 각 펩타이드는 spot 내의 정해진 범위내에서 퍼짐 현상 없이 잘 합성되므로 신뢰성 있는 결과를 보여줄 수 있다.

이 합성 펩타이드가 존재하는 spot paper는 전처리 후에 방사선 동위원소인 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP를 이용하여 UL97으로 인산화 시켰다. 그 결과는 Fig. 1A에 나타내었고, 이를 densitometer로 density를 측정하여 그래프로 나타내었다(Fig. 1B). 예상한 것처럼 K가 가장 효율적으로 인산화가 되었고, 그 다음으로 M, L, I, G가 비슷한 정도로 인산화 효율이 좋았다. 이들은 G를 제외하고는 상대적으로 hydrophobic 아미노산 잔기들이 좋은 효율을 나타내었다. 예상하기로는 positive charge를 띄고 있는 R잔기도 인산화 효율이 K와 유사할 것으로 기대되었으나 상대적으로 낮게 나왔다. 본 연구 결과는 기존에 보고한 UL97에 의해 인산화 되는 펩타이드 들의 P+5 위치에 K가 중요하다는 결과와 일치하였고, A로 치환하였을 경우 그 활성이 거의 사라진다는 것과도 부합하였다. 대부분의 단백질 인산화 효소는 P-3에서 P+3 위치의 특정 아미노산 잔기들이 기질 특이성에 중요한 것으로 보고되었으나 본 연구결과와 기존의 결과에서는 UL97에 의해서 인산화 되는 펩타이드는 P+5 위치에 K를 포함하고 있는 경우 인산화가 잘 되는 것을 확인할 수 있었다. P+5 위치가 중요하다는 것은 기존에 알려져 있는 인산화 효소에 이미 존재하는 특정 subdomain이 포함 되어 있지 않은 것과 관계가 있을 것이다. 그 중에서도 P-3 위치에 음전하를 안정화시킬 수 있는 잔기를 포함하는 것으로 알려진 subdomain V와 VI 위치에 양전하를 갖고 있는 아미노산이 결핍되어 있다. 또한 P+1과 결합하는 subdomain VIII를 가지고 있지 않다.<sup>15,16)</sup> 현재까지는 P+5 위치와 작용을 하는 단백질 인산화 효소는 잘 알려져 있지 않고 있으므로 UL97의 구조 분석을 통하여 어떤 위치의 아미노산이 기질의 P+5 위치와 결합을 하는 지 알아내는 것은 이 효소의 성



**Fig. 1** – Phosphorylation of peptides on the Spot paper by GST-UL97 protein kinase. A. Autoradiography. Each spot contains a peptide with a single amino acid exchange at the K position (P+5) of KASYSVYVYK. The amino acid present at the position is given on top or bottom of the spot results. Y contains same peptide as  $\underline{Y}$  to show reproducibility at marginal location. B. Quantitative evaluation. Relative incorporation of  $^{32}\text{P}$  into peptides was evaluated with x-ray film above by a densitometer. Amino acid substitutions are indicated below.

질을 이해하고 기존의 단백질 인산화 효소와의 관계를 명확히 할 수 있을 것이다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2005년도 경북대학교 학술진흥연구비에 의하여 연구되었습니다.

### 문헌

- 1) Littler, E., Stuart, A. D. and Chee, M. S. : Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**, 160 (1992).
- 2) Sullivan, V., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Davis, M., Coen, D. M. and Biron, K. K. : A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-

infected cells. *Nature* **358**, 162 (1992).

- 3) Prichard, M. N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D. M., Parker, B. O. and Pari, G. S. : A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J. Virol.* **73**, 5663 (1999).
- 4) Krosky, P. M., Baek, M. C. and Coen, D. M. : The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J. Virol.* **77**, 905 (2003).
- 5) Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N. and Mocarski, E. S. : Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1895 (2001).
- 6) Talarico, C. L., Burnette, T. C., Miller, W. H., Smith, S. L., Davis, M. G., Stanat, S. C., Ng, T. I., He, Z., Coen, D. M., Roizman, B. and Biron, K. K. : Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1941 (1999).
- 7) Baek, M. C., Krosky, P. M. and Coen, D. M. : Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J. Virol.* **76**, 11943 (2002).
- 8) Krosky, P. M., Baek, M. C., Jahng, W. J., Barrera, I., Harvey, R. J., Biron, K. K., Coen, D. M. and Sethna, P. B. : The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J. Virol.* **77**, 7720 (2003).
- 9) Baek, M. C., Krosky, P. M., He, Z. and Coen, D. M. : Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J. Biol. Chem.* **277**, 29593 (2002).
- 10) Selleseth, D. W., Talarico, C. L., Miller, T., Lutz, M. W., Biron, K. K. and Harvey, R. J. : *In vitro* activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2186 (2003).
- 11) Biron, K. K., Harvery, R. J., Chamberlain, S. C., Good, S. S., Smith, A. A. 3rd, Davis, M. G., Talarico, C. L., Miller, W. H., Ferris, R., Dornsife, R. E., Stanat, S. C., Drach, J. C., Townsed, L. B. and Koszalka, G. W. : Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2365 (2002).
- 12) Chee, M. S., Lawrence, G. L. and Barrell, B. G. : Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J. Gen. Virol.* **70**, 1151 (1989).
- 13) Crossen, R. and Gruenwald, S. : *In Baculovirus Expression Vector System Manual*, 5th ed. Pharmingen, San Diego (1998).
- 14) He, Z., Kim, Y., Chu, L., Ohmstede, C., Biron, K. K. and Coen, D. M. : The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein

- kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J. Virol.* **71**, 405 (1997).
- 15) Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L.-H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J., Demaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Blenis, J., Hunter, T. and Cantley, L. C. : A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486 (1996).
- 16) Hanks, S. K. and Hunter, T. : Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576 (1995).