

마우스레트로바이러스에 의한 합포체 형성 기작 분석

배은혜 · 박성한 · 정용태*

단국대학교 첨단과학대학 미생물학전공 및 기초과학 연구소

레트로바이러스의 합포체(syncytia) 형성 기작 연구를 위해 합포체 형성을 유도하는 새로운 ecotropic 마우스레트로바이러스(Friend murine leukemia virus) 변이주를 실험에 사용하였다. 마우스레트로바이러스의 외막에 존재하는 당단백질 중 수용체와 결합하는 부위의 아미노산을 변화시키면 합포체를 형성할 수 있음이 이미 밝혀졌다. 본 연구에서는 합포체 유도 마우스레트로바이러스 외막 당단백질을 가진 pseudotype 레트로바이러스 벡터로부터도 이러한 융합 현상이 일어날 수 있는지 알아 보았다. 마우스 세포주인 *M. dunni* 에 pseudotype 바이러스를 감염시킨 결과 레트로바이러스 벡터 매개에 의한 바이러스-세포간 융합 현상은 일어나지 않았다. 이러한 실험 결과는 합포체 형성이 바이러스 복제가 가능한 합포체 유도 마우스레트로바이러스에만 일어남을 나타낸다. 또한 ecotropic 마우스레트로바이러스 수용체의 농도와 막 융합과의 상관관계도 없는 것으로 밝혀졌다.

Key words □ ecotropic mouse retrovirus, envelope, mCAT receptor, *M. dunni*, syncytium

레트로바이러스의 침입은 바이러스 표면의 당단백질이 숙주 세포 표면에 있는 수용체(receptor)에 결합함으로써 시작된다(1). 레트로바이러스의 외막 당단백질은 전구체(precursor molecule)로 합성이 되며 골지체에서 세포내의 protease에 의해 surface (SU) protein과 transmembrane (TM) protein으로 나누어진다. Surface (SU) protein은 oligomer를 형성하며 glycosylation 되는데 바이러스 막의 바깥쪽에 위치하기 때문에 숙주 면역 반응의 표적이 된다. TM 부위에는 막 융합을 매개하는 “fusion peptide”가 존재하며 초기 막융합 과정에서 숙주 세포막과 결합하게 된다(7).

숙주 세포와의 융합을 위해 바이러스의 막 융합 단백질이 점차적으로 형태변화를 일으키는데 형태변화는 수용체와 결합하거나 낮은 pH에 노출됨으로써 일어난다. 이러한 구조의 변화는 숨어 있던 fusion peptide를 바깥쪽으로 노출시켜 막 융합이 일어나도록 유도한다. 이 융합에 의해 바이러스내에 존재하는 물질이 숙주세포로 전달된다. 이러한 막 융합 과정은 influenza virus의 hemagglutinin (HA)과 human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)의 외막당단백질에서 많이 연구 되어졌는데 바이러스 막 표면에 존재하는 단백질에 의한 막 융합은 바이러스의 침입을 허용할 뿐만 아니라 다양한 조건하에서 세포-세포간의 융합을 매개하여 합포체(syncytia: multinucleated giant cell)를 형성한다(5). 합포체 형성은 2가지 기작에 의하여 일어난 것으로 알려져 있는데 하나의 비리온이 2개의 세포와 동시에 융합을 하거나 (fusion from without) 바이러스에 감염되어 바이러스 외막당단백질을 세포표면에 발현하는 세포가 감염되지 않은 이웃 세포와 융합하는(fusion from within) 경우이다(17).

이러한 기작에 의해 HIV에 감염된 lymphocyte는 이 바이러스의 수용체를 가진 CD4(+) lymphocyte와 융합을 일으켜 syncytium을 형성하고 결국에는 p53-mediated apoptosis로 인해 세포가 사멸하게 되는 것으로 알려져 있다. 그 결과 면역반응이 제대로 작동되지 않아 결국 AIDS에 이르게 된다(5). 감염된 환자에 있어서 이러한 helper T 세포수의 감소를 가져오는 기작은 일부 밝혀지고 있으나 아직 연구해야 할 부분이 많다. 비록 이러한 syncytium 형성이 대부분의 손상된 조직이나 혈액에서 쉽게 관찰은 되지 않으나 세포배양과정에서 관찰되는 병인성이 *in vivo*에서의 T 세포수의 감소와 연관이 있을 것으로 추정되어 왔다. 이러한 syncytium 형성과정은 *in vitro*상에서 레트로바이러스와 paramyxovirus를 포함하는 다양한 바이러스의 감염에서 관찰되어졌다(5).

Murine leukemia 바이러스는 레트로바이러스의 병인성 연구를 위한 아주 유용한 도구로 사용되었는데 여러 가지 요인(외막 당단백질의 발현증가, 수용체와의 친화성 증가, 외막당단백질과 바이러스 중심부와의 안정성 감소)이 막 융합 능력을 증가시키는 것으로 알려졌다(12).

최근에 마우스레트로바이러스인 Moloney murine leukemia 바이러스와 Friend murine leukemia 바이러스의 당단백질부위 중 S84, D86, W102의 3개 아미노산이 수용체와 결합하는 것으로 밝혀졌으며 지금까지의 연구 결과 Friend murine leukemia 바이러스의 S84 와 W102의 아미노산 변화가 syncytium 형성에 관여하는 것으로 보고 되었다(4, 8, 9, 14).

이 전의 실험에서 Friend murine leukemia 바이러스의 wild type 감염은 *M. dunni* 세포에 아무런 변화를 일으키지 않았으나 바이러스 외막 당단백질의 RBD (receptor binding domain)에 돌연변이를 가진 바이러스는 syncytium을 형성하였으므로(9) 본 실험

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-550-3453, Fax: 041-550-3409
E-mail: yjung@dankook.ac.kr

험에서는 이러한 돌연변이 바이러스의 외막 당단백질을 가진 pseudotype 바이러스를 이용하여 syncytium 형성 기작을 연구하고자 하였다. 또한 일반적으로 ecotropic murine leukemia 바이러스에 의해서는 감염되지 않는 인간 세포주에 마우스레트로바이러스의 수용체인 mCAT-1 (mouse cationic amino acid transporter 1)을 발현시켜 수용체의 농도가 syncytium 형성 기작에 영향을 미치는지에 대해서도 연구하였다.

재료 및 방법

바이러스와 세포주

Friend murine leukemia 바이러스 중 syncytium을 형성하는 Fr57-S84A 바이러스와 이 바이러스의 외막 당단백질을 가진 pseudotype 바이러스, wild type 외막 당단백질을 가진 pseudotype 바이러스를 사용하였다. Fr57-S84A 바이러스는 FrMLV clone 57 plasmid의 5' env 부위 84번째 아미노산 serine을 alanine으로 ExSite PCR-based site-directed mutagenesis kit를 이용, 치환하여 NIH3T3 세포주에 transfection함으로써 얻어졌다. Pseudotype 바이러스는 Fr57-S84A plasmid의 SU 부위를 pCL-Eco retroviral vector (Imgenex Co., San Diego, Calif, USA)에 치환시킨 후(pCL-S84A) 293 세포주에 transfection하여 얻어졌다(9). *M. dunnii*, NIH3T3, 293 세포는 ATCC (American Type of Cell Collection, USA)에서 분양 받았으며 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), 100u/ml penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

Syncytium 형성

마우스 세포주인 *M. dunnii* 세포를 60mm dish에 (1×10⁵ cells/dish) 배양하였다. 다음날 polybrene (4 µg/ml)과 바이러스(mutant, pseudotype)를 함께 접종하고 배지를 바꾸어 주었다. 2일이 지난 후 매일 dish를 꺼내어 syncytium 형성 여부를 광학현미경으로 관찰하였다. 사진 촬영은 Nikon TS100 현미경과 DXM 1200 디지털 카메라를 이용하였다.

mCAT-1을 발현하는 세포주 확립

Syncytium 형성에 있어서 수용체의 역할을 알아보기 위해 293 인간 세포주에 ecotropic murine leukemia 바이러스의 수용체 유전자를 발현 시켰다. NIH3T3 ecotropic 수용체 유전자 3' 말단 부위에 GFP 유전자가 융합되어 있는 pmCAT-1-GFP plasmid를 Dr. J. Silver (NIAID, Bethesda, MD, USA)로부터 분양 받았다(10, 11, 13). *M. dunnii*에 있는 mCAT-1 수용체 유전자를 증폭하여 pmCAT-1-GFP plasmid와 치환함으로써 pdCAT-1-GFP를 얻었다. 이 plasmid를 FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Sci., Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 293 세포에 도입한 후 800 µg/ml G418에 저항성을 나타내는 colony를 선택하였다. dCAT-1-GFP의 발현여부는 Zeiss 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Germany)로 확인하였다.

Pseudotype assay

293 세포주에 pCL-S84A와 pCLMFG-LacZ를 cotransfection을 하여 상층액을 얻은 후 필터를 하여 ecotropic murine leukemia 바이러스 수용체를 발현하는 293 세포주를 감염시키는데 사용하였다. 1.5×10⁵ 개의 세포를 6-well 배양접시에서 배양한 후 8 µg/ml의 polybrene하에 1 ml의 바이러스로 3시간 동안 감염시켰다. 3시간 후 2 ml의 새로운 배지를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양한 세포는 0.5% glutaraldehyde 용액으로 고정하고 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, 2 mg/ml; ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA)을 기질로 사용하여 β-galactosidase 활성을 측정하였다. 감염되는 바이러스 상층액 1 ml 당 blue colony 갯수로 나타내었다.

결과 및 고찰

레트로바이러스중 RD-114 feline leukemia virus, mouse mammary tumor virus, reticuloendotheliosis virus, avian virus, human immunodeficiency virus, simian immunodeficiency virus 등이 syncytium을 형성하는 것으로 알려져 있다(7). 특히 RD114 바이러스는 내인성 feline 레트로바이러스로서 fusion from without 기작으로 syncytium 형성에 관여하며 RD114 Env를 가진 pseudotype retroviral vector는 스스로 세포를 융합시킬 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 cytotoxic agent로 유전자 치료분야에도 응용되고 있다(6). Ecotropic murine leukemia 바이러스는 amphotericin B 첨가(15), protease 처리(2), 특정 rat 세포주 사용(18) 등 변화된 성장 조건에서만 syncytium을 형성한다. Friend ecotropic murine leukemia 바이러스는 외막 당단백질에 존재하는 세 개의 아미노산이(S84, D86, W102) 수용체와 결합하여 감염에 관여하는 것으로 알려져 있으며 84번째 아미노산이 serine에서 alanine으로 바뀌면 마우스 세포주인 *M. dunnii*에서 syncytium을 형성한다는 사실이 밝혀졌다(4, 9). Syncytium 형성이 바이러스-세포간 융합(fusion from without) 때문인지 세포-세포간 융합(fusion from within) 때문인지 알아보기 위해 *M. dunnii* 세포주를 복제 가능한(replication-competent) Fr57-S84A 바이러스와 복제가 불가능한(replication-incompetent) S84A Env pseudotype 바이러스로 감염시켰다. Fr57-S84A 바이러스는 감염 48시간 후에 syncytium을 형성하는 것이 광학 현미경으로 관찰되었으나 (Fig. 1A) S84A Env를 가진 pseudotype 바이러스에서는 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

이러한 결과는 RD114-pseudotype retroviral vector가 syncytium을 형성하는 기작과는 다르게 Fr57-S84A 바이러스는 세포-세포간 융합에 의해서만 syncytium이 형성된다는 사실을 보여준다. 즉 replication-competent한 바이러스가 syncytium 형성에 필요하다는 것을 나타낸다.

수용체와 결합할 수 있는 것으로 알려진 세 개의 아미노산 중 102 번째 아미노산의 변화도 syncytium을 형성할 수 있는 것으로 TR1.3 바이러스에 의해 밝혀졌다. Ecotropic mouse gammaretrovirus 중 세포병변을 나타내는 변이주가 드물지만은 Friend와

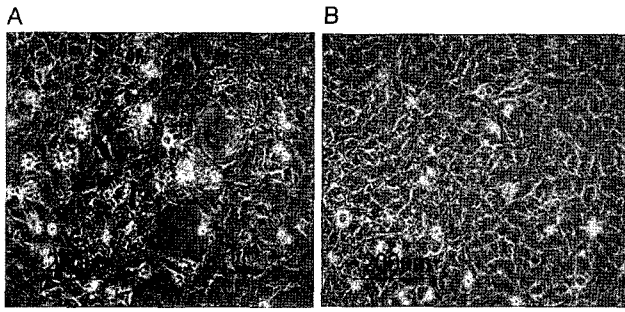


Fig. 1. Syncytium formation in murine *M. dunni* cells. *M. dunni* cells incubated with Fr57-MLV(S84A) developed many multi nucleated cells (A), but *M. dunni* cells incubated with pseudotype virus did not form syncytia (B). Cells were photographed under a light microscope. Objective lens magnification was $\times 20$.

Moloney murine leukemia 바이러스 변이주가 syncytium을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있는데(8, 9) 최초로 분리된 세포병변 변이주가 TR1.3 이라는 neuropathic Friend murine leukemia 바이러스로서 brain endothelial cell (BCEC)에 syncytium을 일으키고 병인성을 나타내는 결정인자가 외막 당단백질 VRA (variable region A)의 102번 아미노산에 위치하고 있음이 밝혀졌다(14). 병인성을 나타내지도 않고 syncytium을 형성하지도 않은 FB29 Friend murine leukemia 바이러스의 102번 아미노산 tryptophan을 TR1.3 Env의 102번 아미노산인 glycine으로 변화시키면 FB29 (W102G) 바이러스는 syncytium을 일으켰으며 여러 가지 병인성이 TR1.3 바이러스가 나타내는 양상과 동일하였다(12, 14). TR1.3을 사용한 최근 실험에 의하면 TR1.3의 당단백질과 수용체와의 친화성이 감소함으로써 TR1.3에 의한 중복감염 (superinfection)을 방해하지 못하여 syncytium을 일으키는 것으로 보고되었다(12). 이러한 결과는 syncytium 형성이 수용체와의 친화성을 감소시키는 외막 당 단백질내 아미노산 변화와 직접적인 연관관계가 있음을 보여주며 Fig. 1(A)에서 보여준 syncytium 형

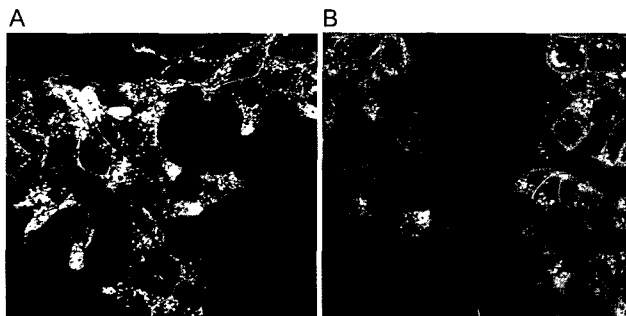


Fig. 2. Cell Surface expression of GFP-tagged dCAT-1 detected by confocal microscope. 293-dCAT-1-H cell line which express high levels of ecotropic receptor (A) and 293-dCAT-1-L cell line which express low levels of receptor (B) were observed under a laser scanning confocal microscope with a filter set suitable for fluorescein detection. Magnification, $\times 630$.

정도 유사한 기작에 의해 일어났을 것으로 생각된다. TR1.3 바이러스에 의해 밝혀졌듯이 레트로바이러스가 병인성을 나타내는 중요 요인은 중복감염 때문이며 중복감염이 일어나게 되면 세포질내에 염색체에 삽입되지 못한 선형의 바이러스 DNA가 축적되고 이러한 선형의 DNA는 손상받은 DNA와의 유사성 때문에 중복 감염된 세포의 apoptosis를 유발한다(9).

Syncytium 형성 기작은 여러 가지 요인들이 관여하는 복잡한 과정인데 적정 농도 이상의 수용체와 높은 감염가를 가진 pseudotype 바이러스가 syncytium 형성에 관여하는 것으로 보고 되어(3, 16) 본 연구에서는 수용체의 농도와 syncytium 형성과의 상관관계에 대해 알아 보고자 하였다. 먼저 ecotropic retrovirus 수용체의 발현 정도가 높은 293 세포주와 낮은 293 세포주를 만들었고 수용체 발현 정도는 FACS와 Zeiss 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Germany)으로 확인하였다(Fig. 2A, B). 293 세포주에서 발현된 ecotropic 바이러스 수용체가 수용체로서의 기능을 하는지 알아보기 위해 NIH3T3, *M. dunni*, 293 세포, 높은 농도로 수용체를 발현하는 293-dCAT1-H 세포, 낮은 농도로 수용체를 발현하는 293-dCAT1-L 세포에 wild type 외막 당단백질을 가진 pseudotype 바이러스와 S84A Env를 가진 pseudotype 바이러스로 감염시켰으며 감염 결과 수용체를 발현하고 있는 293 세포들은 수용체 발현정도의 차이에 관계 없이 수용체로서의 역할을 하였다(Table 1). Pseudotype 바이러스가 syncytium을 형성하는지 알아보기 위해 수용체를 발현하는 293 세포주에 감염시키고 감염 후 48시간이 지난 다음 광학 현미경으로 관찰한 결과 수용체 발현 정도와 상관 없이 syncytium 형성이 관찰되지 않았으며 syncytium이 형성되지 않음을 X-gal 염색을 통하여서도 확인하였다(Fig. 3A, B). 이러한 결과는 아마도 낮은 MOI (5 Multiplicity of Infection)로 감염시킨 것이 한 요인이 될 수 있을 뿐만 아니라 Fig. 1에서 보여준 것처럼 바이러스가 스스로 복제할 수 있는 능력이 없기 때문이다. Transfection을 통하여 얻은 pseudotype 바이러스를 10배, 50배, 100배 정도로 순차적으로 농축하여 감염에 사용하면 수용체의 발현 정도가 syncytium 형성 기작에 관여하는지를 밝히는데 도움을 줄 것이다.

이상의 연구결과는 Friend murine leukemia 바이러스 변이주에 의한 syncytium 형성기작은 바이러스에 감염된 세포가 감염되지 않은 세포와 세포-세포간 융합에 의해 일어남을 나타내고 있다. 또한 수용체 발현 정도와 syncytium 형성과는 상관관계가 없는

Table 1. Virus titers of MLV variants in different cell lines

| Target cell | Log ₁₀ titer of LacZ pseudotype ^a | |
|-----------------|---|-------------|
| | LacZ (wild-type) | LacZ (S84A) |
| NIH3T3 | 4.2 | 4.3 |
| <i>M. dunni</i> | 3.4 | 4.8 |
| 293-dCAT-1-H | 4.2 | 4.9 |
| 293-dCAT-1-L | 4.1 | 4.8 |
| 293 | - | - |

^aTiters are given as CFU per ml.

-, no plaques were detected in cultures infected with 1ml of undiluted virus stock.

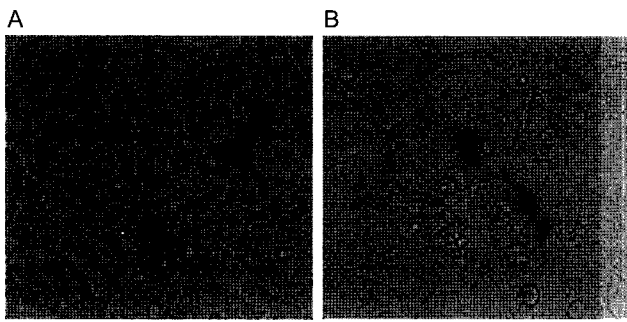


Fig. 3. Susceptibility of dCAT-1-GFP expressing 293 cells to Fr57-MLV (S84A) pseudotype virus. 293 cells with high-level expression of dCAT-1-GFP (panel a) and 293 cells with low-level expression of dCAT-1-GFP (panel b) were inoculated with pseudotype virus. Two days after inoculation, the cells were fixed and stained with X-gal.

것으로 밝혀졌다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Albritton, L.M., J.W. Kim, L. Tseng, and J.M. Cunningham. 1993. Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J. Virol.* 67, 2091-2096.
- Anderson, K.B. and H. Skov. 1989. Retrovirus-induced cell fusion is enhanced by protease treatment. *J. Gen. Virol.* 70, 1921-1927.
- Chung, M., K. Kizhatil, L.M. Albritton, and G.N. Gaulton. 1999. Induction of syncytia by neuropathogenic murine leukemia viruses depends on receptor density, host cell determinants, and the intrinsic fusion potential of envelope protein. *J. Virol.* 73, 9377-9385.
- Davey, R.A., Y. Zuo, and J.M. Cunningham. 1999. Identification of a receptor-binding pocket on the envelope protein of Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 73, 3758-3763.
- Eckert, D.M. and P.S. Kim. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 777-810.
- Germain, E., V.-G. Roulin, J. Qiao, P.O. de Campos Lima, and M. Caruso. 2005. RD114-pseudotyped retroviral vectors kill cancer cells by syncytium formation and enhance the cytotoxic effect of the TK/GCV gene therapy strategy. *J. Gene Med.* 7, 389-397.
- Jones, J.S. and R. Risser. 1993. Cell fusion induced by the murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67, 67-74.
- Jung, Y.T. and C.A. Kozak. 2003. Generation of novel syncytium-inducing and host range variants of ecotropic Moloney murine leukemia virus in *Mus spicilegus*. *J. Virol.* 77, 5065-5072.
- Jung, Y.T., T. Wu, and C.A. Kozak. 2004. Novel host range and cytopathic variant of ecotropic Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 78, 12189-12197.
- Kim, J.W., E.I. Closs, L.M. Albritton, and J.M. Cunningham. 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.
- Masuda, M., N. Kakushima, S.G. Wilt, S.K. Ruscetti, P.M. Hoffman, A. Iwamoto, and M. Masuda. 1999. Analysis of receptor usage by ecotropic murine retroviruses, using green fluorescent protein-tagged cationic amino acid transporters. *J. Virol.* 73, 8623-8629.
- Murphy, S.L., M. Chung-Landers, M. Honczarenko and G.N. Gaulton. 2006. Linkage of reduced receptor affinity and superinfection to pathogenesis of TR1.3 murine leukemia virus. *J. Virol.* 80, 4601-4609.
- Ou, W. and J. Silver. 2003. Role of a conserved amino-terminal sequence in the ecotropic MLV receptor mCAT1. *Virology* 308, 101-108.
- Park, B.H., B. Matuschke, E. Lavi, and G.N. Gaulton. 1994. A point mutation in the *env* gene of a murine leukemia virus induced syncytium formation and neurologic disease. *J. Virol.* 68, 7516-7524.
- Pinter, A., T.-E. Chen, A. Lowey, N.G. Cortez, and S. Silagi. 1986. Ecotropic murine leukemia virus-induced fusion of murine cells. *J. Virol.* 57, 1048-1054.
- Siess, D.C., S.L. Kozak, and D. Kabat. 1996. Exceptional fusogenicity of Chinese hamster ovary cells with murine retroviruses suggests roles for cellular factor(s) and receptor clusters in the membrane fusion process. *J. Virol.* 70, 3432-3439.
- White, J., M. Kielian, and A. Helenius. 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* 16, 151-195.
- Wong, P.K.Y., P.H. Yuen, and S.J. Kaufman. 1977. Induction of syncytia by Moloney murine leukemia virus in myoblasts defective in differentiation. *J. Virol.* 21, 319-327.

(Received June 29, 2006/Accepted July 20, 2006)

ABSTRACT: Analysis of Syncytium Formation Mechanism induced by Ecotropic Murine Retrovirus
Eun Hye Bae, Sung-Han Park, and Yong-Tae Jung* (Department of Microbiology and Institute of Basic Science, College of Advanced Science, Dankook University, Cheonan-si, 330-714, Korea)

To study the mechanism of syncytium formation, novel syncytia-inducing ecotropic murine retrovirus was used. Our previous result showed that amino acid substitutions at the RBD (receptor binding domain) of envelope gly-

coprotein contribute to syncytium formation. In this study, we have investigated if this fusion phenomenon could occur with retroviral vectors pseudotyped with the novel syncytia-inducing ecotropic murine leukemia virus Env. We have found that these vectors were not able to mediate virus-to-cell fusion in *M. dunnii* murine cell lines. These findings indicate that syncytia-inducing ecotropic murine leukemia virus is capable of generating syncytia during its replication. There was also no correlation between the level of ecotropic murine leukemia virus receptor (mCAT-1) and the fusogenic effect.