

원조포미바이러스 U5 LTR 말단의 보존적인 잔기의 돌연변이에 대한 인테그라제의 반응성

현우석 · 이동현 · 고희탁 · 신차균[#]

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

(Received December 18, 2007; Revised February 4, 2008)

Reactivity of Prototype Foamy Virus Integrase to the Mutants of the Highly Conserved Terminal Sequence of U5 LTR

Usok Hyun, Dong Hyun Lee, Hyun Tak Ko and Cha-Gyun Shin[#]

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong, Kyungki 456-756, Korea

Abstract — The long terminal repeat (LTR) of retroviral DNA genome plays an important role in the integration process by providing substrate recognition site for viral integrase (IN). The dinucleotide CA near the 3'-end of the LTR termini is completely conserved among retroviruses. In order to study specificity of interaction between prototype foamy virus (PFV) IN and its U5 LTR DNA, the effect of mutagenesis of the CA sequence was investigated by studying reactivity of PFV IN to the mutant LTR substrates. Replacement of only the C or the A allowed 60 to 100% of the reactivity of the wild type LTR substrate. In addition, replacement of the C and the A showed 50 to 80% of the reactivity of the wild type LTR substrate, indicating that PFV IN has less specificity on the conserved CA sequence when it is compared to the other retroviral INs. Therefore it is suggested that PFV IN is less dependent on the conserved sequence of LTR termini for its enzymatic reaction.

Keywords □ integrase, foamy virus, U5 LTR, conserved

포미바이러스는 레트로바이러스의 일원으로 spumaretrovirus라고도 부르며, 1954년 원숭이 신장세포에서 처음 발견되었다.¹⁾ 이름에서 나타내듯이 이들이 감염된 세포들은 원형질에 거품 모양을 형성한다. 이 바이러스들은 주로 원숭이 계통의 영장류를 감염하며, 비영장류로 고양이, 소, 말 등을 감염하며, 인간을 직접적으로 감염하지는 않는다.²⁾ 초기에 인간포미바이러스(human foamy virus, HFV)라고도 알려졌던 원조포미바이러스(prototype foamy virus, PFV)는 우연한 경로로 인간에 감염된 원숭이 포미바이러스의 일종으로 판명되었다.^{3,4)} 포미바이러스로는 최초로 발견된 원조 포미바이러스는 원숭이 포미바이러스이며, 바이러스 유전자는 약 12 kb의 동일한 2 개의 RNA로서, 레트로바이러스로서는 가장 큰 genome이다. 전통적인 레트로바이러스들과 같이 감염 직후에 역전사 효소에 의하여 DNA genome이 만들어지나, 세포내에서 바이러스 입자가 만들어진 후에 바이러스 입

자 내에서 역전사의 작용에 의하여 RNA 유전자를 DNA 유전자로 바꾸어 갖고 있는 바이러스 입자들이 많이 존재한다.⁵⁾ 이러한 점은 전통적인 레트로바이러스와 구별되는 점이다. 따라서 세포 밖으로 유리된 바이러스 입자들에는 바이러스 입자에 따라 RNA 유전자 또는 DNA 유전자를 갖고 있다.^{6,7)} DNA 유전자를 갖는 바이러스도 세포를 감염하면 DNA 유전자가 핵 안으로 이동하고 DNA 유전자는 감염세포의 유전자에 중합(integration)된다. 중합된 유전자의 발현과 전사 작용으로 원형질에서 형성된 자손바이러스 입자들은 세포 내 막기관을 통하여 세포 밖으로 배출되기도 하고, 일부는 세포 안에서 재순환 과정을 거쳐서 역전사작용으로 DNA 유전자를 만들어 다시 핵 안으로 들어와서 integration되기도 한다. 원형질에서 형성된 자손바이러스의 재순환과정은 다른 전통적인 레트로바이러스와 전혀 다른 복제과정으로, 이 부분은 간염 B형 바이러스와 같은 복제의 유형을 보여준다.⁸⁾

전통적인 레트로바이러스들의 인테그라제와 유전자의 integration 과정은 많은 연구가 되어 있으나, 포미바이러스의 인테그라제와 integration 과정에 대한 것은 거의 연구가 되어지지

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-670-3067 (팩스) 031-675-0409
(E-mail) cgshin@cau.ac.kr

않고 있다. 그러나 현재까지 밝혀진 자료들에 의하면, 포미바이러스 유전자의 integration 과정은 감염된 세포 안으로 도입된 유전자의 종류에 관계없이 포미바이러스가 성공적으로 자손바이러스를 생성하기 위하여 반드시 거쳐야 하는 과정으로, 바이러스의 특유 효소 인테그라제(integrase)에 의하여 일어난다.⁹⁾ 전통적인 레트로바이러스들과 같이 바이러스 DNA 유전자의 양쪽 끝인 U5 LTR과 U3 LTR의 3'-말단의 2개의 nucleotide가 절단된 후, 양쪽 끝이 감염세포의 절단된 유전자에 연결되어 integration 되는 것으로 추측하고 있다.

원조포미바이러스의 인테그라제의 분자량은 약 43,000 Da이며, 정제된 단백질은 인간면역결핍바이러스보다 용해도가 좋다.¹⁰⁾ 다른 전통적인 레트로바이러스의 인테그라제들과 같이 분리 정제된 인테그라제 단백질은 U5 LTR이나 U3 LTR의 양끝의 염기서열을 닮은 duplex oligonucleotide를 기질로 이용하여 *in vitro*에서 효소활성을 측정할 수 있다. 전통적인 레트로바이러스들의 인테그라제의 기질에 대한 특성은 duplex oligonucleotide 기질의 염기서열을 바꾼 돌연변이 기질을 *in vitro*에서 효소와 반응시켜 반응이 진행되는 정도를 비교하여 분석된 바 있다.^{11,12)} 전통적인 레트로바이러스들의 인테그라제들은 자신의 DNA 유전자를 인식할 때, U5 LTR과 U3 LTR의 3'-말단의 3번째부터 10~12번째까지의 염기서열을 선택적으로 인식한다.¹³⁻¹⁶⁾ 따라서 이 부분의 염기서열의 변화는 인테그라제가 기질 DNA에 작용하는 반응성을 크게 감소시킨다. 특히 각 LTR의 3'-말단에서 4번째와 3번째에 존재하는 CA 서열은 현재 밝혀진 모든 레트로바이러스의 LTR

염기서열에서 동일하게 보존되고 있는 서열로서 인테그라제의 효소 활성작용에 매우 중요하다(Table I). 따라서 전통적인 레트로바이러스의 기질 DNA에서 이 부분의 염기서열이 변화된 경우에는 인테그라제에 의하여 끝 부분의 2개의 nucleotide를 잘 절단하지 못하였다. 원조포미바이러스의 인테그라제의 작용도 기질 DNA의 염기서열 중에서 3'-말단에서 4번째와 3번째에 존재하는 CA 염기서열의 변화에 크게 영향을 받을 것으로 사료되며, 본 연구에서는 이 부분의 돌연변이 기질들을 제작하여 각 돌연변이 기질들의 인테그라제에 대한 반응성을 조사하였다.

실험 방법

시약 및 재료

바이러스 DNA 기질로 사용된 oligonucleotide들은 Takara (Seoul, Korea)에서 제작하였다. Oligonucleotide들은 사용하기 전에 15% acrylamide에서 분리, 정제하여 사용하였다. 기질의 표식에 사용한 방사능 [γ -³²P]ATP는 Amersham에서 구매하였다. T4 DNA kinase는 New England Biolabs(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 원조포미바이러스 인테그라제 단백질의 생산과 정제에 필요한 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

포미바이러스 인테그라제의 정제

원조포미바이러스 인테그라제 단백질의 정제는 발현백터인 pETFIN을 함유하는 대장균[BL21(DE3)] 균주를 이용하였으며, 정제 방법은 본 연구실에서 예전에 발표한 방법을 약간 변형하여 사용하였다.¹⁷⁾ 간단히 요약하여, 발현백터를 함유하는 균주를 항생제 함유 LB 배지에서 흡광도가 600 nm에서 0.7이 될 때까지 배양한 후, isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)를 첨가하고 3시간 동안 더 배양하였다. 수집한 배양 균체의 침전체를 완충용액 S1[50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 20 mM β -MeOH, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10 mM imidazole]에 현탁한 후 lysozyme을 1 mg/ml로 첨가한다. 얼음에서 30분간 방치한 후, 고농도의 NaCl과 CHAPS를 각각 첨가하여 최종농도가 1 M과 10 mM이 되게 하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기(\times L2020, Misonix, USA)을 이용해서 균체를 파괴하고, 파괴된 균체의 용액을 4에서 40,000 \times g로 20분간 원심분리하여 integrase 단백질을 함유하는 상등액을 따로 수집하였다. 상등액을 미리 준비한 Ni-NTA column(Qiagen; Valencia, USA)을 통과시키고, 완충용액 S10[50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 20 mM β -MeOH, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 10 mM imidazole, 1 M NaCl, 10 mM CHAPS]로 충분히 세척한 후, 완충용액 S10에 imidazole의 농도를 증가시키면서 integrase 단백질의 추출을 유도하였다. NTA 컬럼에서 정제한 integrase는 SP-sepharose 컬

Table I – Terminal sequences of retroviral LTR DNA

	Terminal sequences
HIV-1 U5 LTR	5'-TGTGG AAAAT CTCTA <u>GCAGT</u> -3'
HIV-1 U3 LTR	5'-ACTGG AAGGG CTAAT <u>TCACT</u> -3'
HIV-2 U5 LTR	5'-GCAGG AAAAT CCCTA <u>GCAGG</u> -3'
HIV-2 U3 LTR	5'-TGTA AACAT CCCT <u>CCAGT</u> -3'
SIV U5 LTR	5'-GCAGG AAAAT CCCTA <u>GCAGT</u> -3'
SIV U3 LTR	5'-TGGAA GGGAT TTATT <u>ACAGT</u> -3'
FIV U5 LTR	5'-CGGGC CGAGA ACTTC <u>GCAGT</u> -3'
HTLV-1 U5 LTR	5'-GGAGA GAAAT TTAGT <u>ACACA</u> -3'
Visna U5 LTR	5'-ACCGG AGCGG ATCTC <u>GCAGG</u> -3'
MuLV U5 LTR	5'-GTCAG CGGGG GTCTT <u>TCATT</u> -3'
MuLV U3 LTR	5'-TACAG GTGGG GTCTT <u>TCATT</u> -3'
EIAV U5 LTR	5'-TCTGT TCGAG ATCCT <u>ACAGT</u> -3'
MoMLV U5 LTR	5'-GTCAG CGGGG GTCTT <u>TCATT</u> -3'
ASLV U5 LTR	5'-ATGAA GCAGA AGGCT <u>TCATT</u> -3'
ASLV U3 LTR	5'-GTATT GCATA AGACT <u>ACATT</u> -3'
PFV U5 LTR	5'-ATACA AAATT CCATG <u>ACAAT</u> -3'

Abbreviations used: LTR, long terminal repeats; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HIV-2, human immunodeficiency virus type 2; SIV, simian immunodeficiency virus; FIV, feline immunodeficiency virus; HTLV-1, human T-cell leukemia virus type 1; MuLV, murine leukemia virus; EIAV, equine infectious anemia virus; MoMLV, Moloney murine leukemia virus; ASLV, avian sarcoma leukosis virus; PFV, prototype foamy virus. The highly conserved sequence, CA, is underlined.

를 이용하여 추가적인 정제하였다. Integrase를 함유하는 추출액을 완충용액 S25-100[50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 20 mM β-MeOH, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSE, 100 mM NaCl, 10 mM CHAPS]에서 투석하고, 미리 준비된 SP-sepharose 컬럼을 통과시켰다. 완충용액 S25-100으로 충분히 세척 후, S25-100에 NaCl의 농도를 높여가면서 추출을 유도하였다. 비특이적 nuclease가 제거된 포미바이러스 integrase를 600 mM NaCl 근처에서 추출하였다.

기질 duplex oligonucleotide 제작 및 효소활성 측정

3'-processing 반응 기질은 바이러스 DNA의 U5 LTR 끝의 염기서열과 동일한 20 base-pair의 이중가닥 올리고핵산을 방사능으로 표식하여 기질로 사용하였다.¹⁸⁾ 50 pmol의 (+) sense strand의 올리고핵산을 50 μCi의 γ³²P-ATP(3000 Ci/mmol, 1 Ci=37 GBq, Amersham)를 함유하는 40 μl의 반응용액(70 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT)에서 10 unit의 T4 PNK로 37°C에서 60분간 처리하고, 0.5 M EDTA 와 5 M NaCl 1 μl을 첨가하였다. 방사능으로 표식한 올리고핵산에 염기서열로서 상호보완적인 올리고핵산(-) sense strand]을 60 pmol 넣은 후, 3분간 100°C에서 가열하고 천천히 식힌다. 반응액을 biospin-6를 통과시켜, 반응하지 않은 γ³²P-ATP를 제거하였다. Biospin 전후의 일정 시료를 15% acrylamide gel에서 전기영동하고, 분리된 20mer의 양을 phosphoimage analyzer로 분석하여 방사능이 표식된 올리고기질의 농도를 측정하였다.¹⁸⁾

3'-processing 반응은 기본적으로 20 mM HEPES[pH 7.5], 5 mM MnCl₂, 10 mM DTT, 0.05% NP40을 함유하는 반응용액 10 μl에, 최종농도로써 방사능으로 표식된 기질 10 nM, 효소 100 nM을 넣고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후, 5 μl의 정지용액(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 첨가하여 정지시키고 90°C에서 3분간 가열한 후 15% acrylamide gel에서 분석하였다. 20mer의 올리고핵산 기질이 18mer로 전환된 반응의 진행정도는 건조한 전기영동 젤을 phosphoimage analyzer(GS-525, Bio-Rad)에서 정량하였다.

결과 및 고찰

원조포미바이러스 U5 LTR 돌연변이 기질의 제작

레트로바이러스의 integration 과정에서 바이러스 유전자의 양 끝인 LTR 말단부분만이 integration 기구들에 의하여 인식되는 바이러스 DNA의 유일한 부분들이다.^{19,20)} 따라서 바이러스 끝 부분의 10여개의 nucleotide들의 염기서열은 레트로바이러스마다 독특한 염기서열을 갖고 있고, 각 레트로바이러스의 인테그라제들은 이 염기서열들을 선택적으로 인식한다.^{15,16,21)} 따라서

Table II – Sequences of mutant oligonucleotide substrates of PFV U5 LTR used for 3'-processing cleavage reaction

Substrate	Sequences of (+) strands of duplex oligonucleotides ^a
WT	5'-ATACA AAATT CCATG <u>ACAAT</u> -3'
3G	5'-ATACA AAATT CCATG ACGAT-3'
3T	5'-ATACA AAATT CCATG ACTAT-3'
3C	5'-ATACA AAATT CCATG ACCAT-3'
4G	5'-ATACA AAATT CCATG AGAAT-3'
4T	5'-ATACA AAATT CCATG ATAAT-3'
4A	5'-ATACA AAATT CCATG AAAAT-3'
43AG	5'-ATACA AAATT CCATG AAGAT -3'
43AT	5'-ATACA AAATT CCATG AATAT -3'
43AC	5'-ATACA AAATT CCATG AACAT -3'

^aThe conserved CA sequence in the wild type (WT) PFV U5 LTR is underlined. Mutated sequences are indicated as bold.

인테그라제의 기질 특이성은 이 부분의 염기서열에 의하여 결정된다. Table I에서 보는 것과 같이 LTR 말단 부분의 10여개의 nucleotide들의 염기서열이 레트로바이러스마다 각기 다른 염기서열을 갖고 있음에도 불구하고, LTR 양쪽의 3'-말단에서 세 번째 염기(A)와 네 번째의 염기(C)는 거의 모든 레트로바이러스에서 변화하지 않은 염기서열이다. 따라서 인간면역결핍바이러스의 경우, 이 염기들의 치환은 인테그라제의 반응성을 크게 떨어뜨린다.^{13,14,22)} 본 연구에서는 원조포미바이러스의 U5 LTR 말단의 보존적인 CA 염기서열의 돌연변이들을 Table II에서와 같이 제작하였다.

원조포미바이러스 인테그라제의 돌연변이 기질에 대한 반응성

레트로바이러스의 인테그라제의 효소활성은 바이러스 LTR 유전자의 끝 부분의 염기서열을 닮은 duplex 올리고핵산을 이용하여 측정할 수 있다.¹¹⁾ 인테그라제의 3'-processing 활성은 바이러스 LTR 유전자의 3'-말단 끝 부분의 2개의 핵산을 선택적으로 제거한다(Fig. 1A). 바이러스 U5 LTR의 3'-말단 염기서열들 중에서 4번째 잔기에만 돌연변이들을 갖는 기질들에 대한 원조포미바이러스 인테그라제의 반응성을 조사하였다(Fig. 1B). 전기영동의 결과는 같은 위치라도 치환된 염기의 종류에 따라 반응의 정도가 크게 차이가 나고 있음을 알 수 있다. 정량적인 분석을 하기 위하여, 3번 이상의 독립된 실험의 결과로, 각 반응에서 반응기질 중에서 인테그라제에 의하여 2개의 nucleotide가 제거되어 18mer의 올리고핵산으로 전환된 비율을 조사하였을 때, 정상적인 기질(WT)은 각각 5, 15, 60분 동안에 15.7±5.9, 46.3±7.7, 78.6±3.5%의 기질이 생성물로 전환되었다. 반면에 기질의 3'-말단에서 4번째 염기가 cytosine(C)에서 guanine(G)으로 치환된 4G 기질은 같은 반응시간에 6.3±2.1, 27.3±8.4, 63.7±6.5%가 각각 전환되었으며, thymine(T)으로 치환시킨 4T 기질은 22.0±5.7, 51.6±7.4, 82.0±4.3%가 전환되었고, adenine(A)으로 치환한 4A 기질은 5.7±3.5, 22.0±5.3, 57.3±8.1%가 전환되었

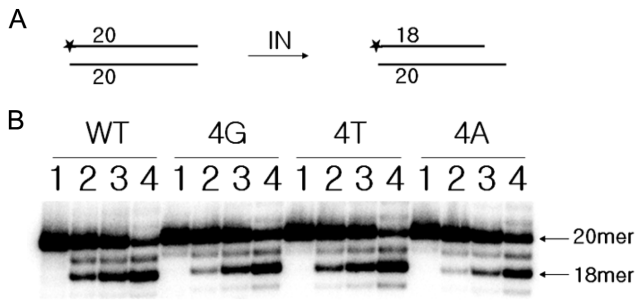


Fig. 1 – 3'-processing cleavage reaction. A. Schematic illustration of 3'-processing cleavage reaction. The star (★) indicates radioactive ^{32}P that is attached to the 5'-end of the (+) strand of duplex oligonucleotides. B. 3'-processing cleavage of the PFV U5 LTR substrates. A 20mer oligonucleotide mimicking PFV U5 LTR was labeled with $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP and annealed with its complementary oligonucleotide. The purified substrate of 0.1 pmol was incubated with the integrase of 3 pmol for 0 (1), 5 (2), 15 (3), or 60 (4) min at 37°C, respectively. The reaction products were analyzed in a 15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography. WT indicates normal PFV U5 LTR substrate. 4G, 4T and 4A indicate the substrate replaced with guanine, thymine, and adenine residues at the 4th position of the 3'-end, respectively.

다. 이러한 결과는 U5 LTR의 3'-말단의 4번째 염기가 thymine으로 치환된 경우에는 정상적인 기질과 동등한 수준에서 반응이 일어났으며, 다른 두 염기로의 치환에서도 각각 정상적인 기질이 전환된 수준의 60~100% 수준에서 반응이 일어난 것을 보여주고 있어, 인간면역결핍바이러스 U5 LTR 기질의 4번째 위치를 다양한 nucleotide로 치환시킨 기질들이 인간면역결핍바이러스 인테그라제에 의하여 20~30%의 기질들만이 전환된 것과 매우 대조된다.^{13,14)} 이러한 차이는 효소의 기질 특이성의 차이에 의하여 나타날 것으로 사료된다. 따라서 U5 LTR의 3'-말단의 4번째 잔기 cytosine의 잔기가 조사된 모든 레트로바이러스에서 보존적인 잔기이기는 하지만, 원조포미바이러스를 포함한 일부의 바이러스들의 경우, 다른 염기로 치환되어도 인테그라제는 바이러스 유전자의 도입을 성공적으로 수행할 수 있을 것 같다.

U5 LTR의 3'-말단의 또 다른 보존적인 잔기는 3번째 위치의 adenine(A)이다. 이 잔기의 돌연변이에 대한 효소의 반응성을 알아보기 위하여, 위와 같은 방법으로 이 위치에 돌연변이를 갖는 기질을 만들어 5, 15, 60분 동안 인테그라제와 반응시켰다 (Fig. 2). 전기영동의 결과가 보여주고 있듯이, 3번째 잔기가 guanine 또는 thymine으로 치환된 경우, 정상적인 기질의 반응성보다 많이 떨어지고 있음을 알 수 있다. 반복 실험을 통한 정량적인 분석에서 3번째 위치에 guanine을 갖는 3G 기질은 5, 15, 60분 동안의 반응에서, 각각 4.3 ± 1.5 , 15.0 ± 6.5 , $43.7 \pm 5.1\%$ 의 기질이 반응하였으며, thymine을 갖는 3T 기질은 6.3 ± 2.1 , 35.8 ± 5.0 , $53.0 \pm 3.5\%$ 가 전환되었다. 반면에 cytosine을 갖는 3C 기질은

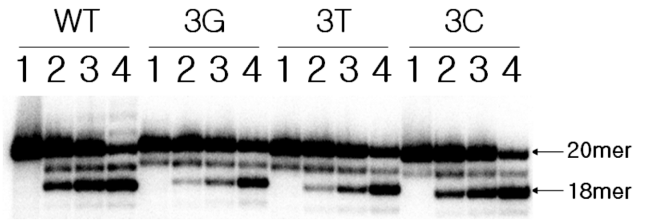


Fig. 2 – Reactivity of the PFV U5 LTR substrates containing a mutation at the 3rd position of its 3'-end. The substrate of 0.1 pmol was incubated with the integrase of 3 pmol for 0 (1), 5 (2), 15 (3), or 60 (4) min at 37°C, respectively. The rest of the reaction are same as described in Fig. 1B. WT indicates normal PFV U5 LTR substrate. 3G, 3T and 3C indicate the substrate replaced with guanine, thymine, and cytosine residues at the 3rd position of the 3'-end, respectively.

15.3 ± 4.1 , 42.0 ± 7.8 , $78.0 \pm 4.1\%$ 가 전환되어 정상적인 기질 (WT)과 매우 유사한 반응성을 나타내었다. 이러한 결과는 4번째 위치의 돌연변이가 기질들의 결과와 마찬가지로 면역결핍바이러스 U5 LTR의 3번째 위치 돌연변이가 기질들의 반응성이 전반적으로 떨어지는 것과 비교하여 상대적으로 반응성이 높은 것이나, 3번째 위치에 치환되는 잔기가 guanine이나 thymine인 경우 반응성이 매우 떨어지고 cytosine인 경우는 반응성이 높은 현상은 면역결핍 바이러스 U5 LTR의 3번째 위치의 돌연변이가 기질들의 반응 결과와 일치하고 있다.^{13,14)}

원조포미바이러스 U5 LTR의 3번째, 4번째 위치의 개별 돌연변이 기질들이 반응성이 높은 현상이 같은 위치에서 이중돌연변이가 기질에서도 나타나는 것을 알기 위하여, 4번째 위치에 돌연변이를 갖는 기질들 중에서 가장 반응성이 낮은 4A 기질을 기준으로 동시에 3번째 위치에 다른 잔기들로 치환된 이중돌연변이 기질들을 제작하고 이들의 반응성을 조사하였다 (Fig. 3). 4번째와 3번째 위치에 adenine과 guanine을 갖는 43AG 기질은 5, 15, 60분 동안의 반응에서, 각각 4.0 ± 1.4 , 11.5 ± 2.1 , $38.8 \pm 3.1\%$ 의 기질이 전환되었고, 각각의 위치에 adenine과 thymine을 갖는 43AT 기질은 4.5 ± 1.7 , 14.3 ± 1.9 , $52.5 \pm 2.9\%$ 의 기질이 전환되었으며, adenine과 cytosine을 갖는 43AC 기질은 각각 5.5 ± 1.2 , 19.8 ± 2.2 , $65.5 \pm 3.1\%$ 의 기질이 전환되었다. 이러한 결과는 두 개의 위치가 모두 치환되어도 정상적인 기질의 반응성에 비하여 50~80%의 반응성을 보인 것으로, 포미바이러스 인테그라제는 보존적인 잔기인 CA 잔기에 대하여 특이성이 상대적으로 다른 레트로바이러스 인테그라제에 비하여 떨어진다.

레트로바이러스 유전자의 말단의 염기서열은 레트로바이러스 인테그라제가 바이러스 DNA를 인식하고, 끝 부분을 절단하고 세포의 유전자에 도입하는 부분이다. 이 부분들의 염기서열의 특징적인 배열은 인테그라제의 기질 특이성을 갖게 한다. 그러나 이 부분의 염기서열이 각 바이러스마다 특징적임에도 불구하고

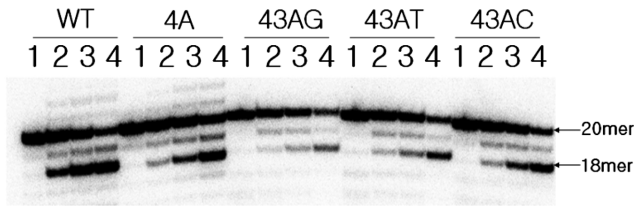


Fig. 3 -3'-processing cleavage reaction using double mutant substrates. The (+) oligonucleotide containing double mutations at the 3rd and 4th positions of its 3'-end was labeled with γ^{32} P-ATP and annealed with its complementary oligonucleotide. The substrate of 0.1 pmol was incubated with the integrase of 3 pmol for 0 (1), 5 (2), 15 (3), or 60 (4) min at 37°C, respectively. The rest of the reaction are same as described in Fig. 1B. WT indicates normal PFV U5 LTR substrate. 4A indicate the substrate replaced with adenine residue at the 4th position of the 3'-end. 43AG, 43AT, and 43AC represent double mutant substrates replaced with adenine residue at the 4th position and with guanine, thymine, and cytosine residues at the 3rd position of the 3'-end, respectively.

고, 3'-말단의 4번, 3번의 잔기는 현재까지 보고된 모든 레트로바이러스에서 CA를 갖고 있다(Table I). 따라서 이 CA 서열은 레트로바이러스 인테그라제들이 기질 DNA를 인식할 때 공통적으로 인식되는 잔기들로 여겨진다. 면역결핍바이러스 U5 LTR 기질에서 CA서열을 다른 잔기들로 치환하는 경우 인테그라제가 이 부분을 인식하고 절단하는 효율이 매우 낮아졌다.^{13,22)} 그러나 원조포미바이러스의 경우, 이 부분이 다른 nucleotide로 치환된 기질들은 정상적인 기질의 반응성에 비하여 단일 치환의 경우 60~100%, 이중 치환의 경우 50~80% 수준에서 반응을 나타내어, 이 부분의 염기서열 변화가 면역결핍바이러스 U5 LTR에 비하여 인테그라제의 반응에 치명적이 아님을 알 수 있고, 또한 포미바이러스 LTR 기질들의 효소에 대한 반응의 특이성이 떨어질 수 있음을 제시한다. 레트로바이러스 인테그라제의 기질 특이성을 연구하기 위하여, 여러 레트로바이러스에서 바이러스 LTR 말단의 치환된 기질을 이용한 보고들은 많이 있지만,^{22,23)} 면역결핍 바이러스를 제외하고 다른 레트로바이러스에서는 LTR 말단 부분의 4번, 3번 위치의 치환된 기질에 대한 보고된 결과가 없다. 본 연구를 통하여 원조포미바이러스에서 LTR 말단의 4번, 3번 위치의 CA 잔기의 치환이 최소한 *in vitro*에서 인테그라제의 효소작용에는 치명적이지 않다는 것을 제시하나, 실질적으로 *in vivo*에서 바이러스 DNA가 중합되는 과정에서도 적용할 수 있는지는 알 수 없다. 모든 레트로바이러스 LTR 말단에서 CA 잔기가 보존되어 있다는 사실은 레트로바이러스의 생활사와 관련하여 바이러스 유전자의 중합과정에서 아직까지 파악하지는 못한 생물학적 의미가 있을 것으로 사료한다. 이러한 의미를 밝혀내기 위해서는 다른 레트로바이러스 LTR 말단에서 치환된 기질을 이용하여 더 폭 넓은 연구와 치환된 LTR 유전자를 갖는 바이러

스 DNA 유전자를 이용한 바이러스 생산의 연구를 통하여 향후 규명될 수 있을 것이다.

결 론

1. 원조포미바이러스 U5 LTR 기질의 3'-말단에서 세 번째 또는 네 번째 위치의 잔기가 치환된 돌연변이 기질에 대하여 원조포미바이러스 인테그라제는 정상적인 기질에 나타내는 반응의 60~100%의 반응을 보였다.
2. U5 LTR 기질의 3'-말단에서 2개의 보존적 잔기가 모두 치환된 돌연변이 기질들도 원조포미바이러스 인테그라제가 정상적인 기질에 나타내는 반응성의 50~80%의 반응성을 보여준다.
3. 원조포미바이러스 U5 LTR 기질의 말단의 보존적 잔기인 CA에 대한 원조포미바이러스 인테그라제의 특이성은 다른 레트로바이러스들의 인테그라제가 보존적 잔기에 나타내는 특이성보다 훨씬 낮다.

감사의 말씀

본 연구는 2006학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. : HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**, 1211 (1991).
- 2) Murray, S. M. and Linial, M. L. : Foamy virus infection in primates. *J. Med. Primatol.* **35**, 225 (2006).
- 3) Malmquist, W. A., van der Maaten, M. J. and Boothe, A. D. : Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electromicroscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* **29**, 188 (1969).
- 4) Rethwilm, A., Baunach, G., Netzer, K. O., Maurer, B., Borisch, B. and Meulen, V. : Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res.* **18**, 733 (1990).
- 5) Delelis, O., Lehmann-Che, J. and Saib, A. : Foamy viruses - a world apart. *Cur. Opin. Microbiol.* **7**, 400 (2004).
- 6) Yu, S. F., Sullivan, M. D. and Linial, M. L. : Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* **73**, 1565 (1999).
- 7) Delelis, O., Saib, A. and Sonigo, P. : Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *J. Virol.* **77**, 8141 (2003).
- 8) Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S. and Linial, M. L. : Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579 (1996).
- 9) Essle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer,

- B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D. and Rethwilm, A. : An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J. Gen. Virol.* **80**, 1445 (1999).
- 10) Oh, Y.-T. and Shin, C.-G. : Comparison of enzymatic activities of the HIV-1 and HFV integrases to their U5 LTR substrates. *Bio. Mol. Biol. Int.* **47**, 612 (1999).
- 11) Bushman, F. D. and Craigie, R. : Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein *in vitro*: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1339 (1991).
- 12) Craigie, R., Fugiwara, T. and Bushman, F. : The IN protein of moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration *in vitro*. *Cell* **62**, 829 (1990).
- 13) Lafemina, R. L., Callahan, P. L. and Cordingley, M. G. : Substrate specificity of recombinant human immunodeficiency virus integrase protein. *J. Virol.* **65**, 5624 (1991).
- 14) Vink, C., Gent, V. C., Elgersma, Y. and Plasterk, R. : Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. *J. Virol.* **65**, 4636 (1991).
- 15) Katzman M. and Sudol, M. : Influence of subterminal viral DNA nucleotides on differential susceptibility to cleavage by human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases. *J. Virol.* **70**, 9069 (1996).
- 16) Balakrishnan, M. and Jonsson, G. B. : Functional identification of nucleotides conferring substrate specificity to retroviral integrase reactions. *J. Virol.* **71**, 1025 (1997).
- 17) Lee, H. S., Kang, S. Y. and Shin, C.-G. : Characterization of the functional domains of human foamy virus integrase using chimeric integrases. *Mol. Cells* **19**, 246 (2005).
- 18) Oh, J.-W., Oh, Y.-T., Kim, D. J. and Shin, C.-G. : Characterization of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Cells* **7**, 688 (1997).
- 19) Ellison, V. and Brown, P. O. : A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates HIV integration *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7316 (1994).
- 20) Rice, P., Craigie, R. and Davies, D. R. : Retroviral integrases and their cousins. *Curren. Opin. Struct. Biol.* **6**, 76 (1996).
- 21) Zhou, H., Rainey G. J., Wong, S.-K. and Coffin, J. M. : Substrate sequence selection by retroviral integrase. *J. Virol.* **75**, 1359 (2001).
- 22) Masuda, T., Kuroda, M. J. and Harada, S. : Specific and independent recognition of U3 and U5 *att* sites by human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vivo*. *J. Virol.* **72**, 8396 (1998).
- 23) Reicin, A. S., Kalpana, G., Paik, S., Marmon, S. and Goff, S. : Sequence in the human immunodeficiency virus type 1 U3 region required for *in vivo* and *in vitro* integration. *J. Virol.* **69**, 5904 (1995).