

Identification of NLS motif in IHNV NV protein

문창훈 · 최명규 · 도정완* · 차승주* · 박정우
울산대학교 생명과학부, *국립수산과학원 병리연구팀

서론

In this study, we examined subcellular localization of NV by using enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusions. NV-EGFP is localized in the nucleus. we further found that N-terminal of NV protein are required for nuclear localization. The results suggest that NV predominantly localizes to the nuclear region. To determine regions within the NV responsible for the nuclear localization, we prepared several deletion mutant of NV. Confocal images of cells transfected with these mutants suggest that N-terminal region (aa 18-35) of NV is essential for the nuclear localization. However, we could not find any conventional nuclear localization signal (NLS) within these region, which suggest that the NV might contain novel NLSs.

재료 및 방법

IHNV-PRT (Park *et al.*, 1993)을 CHSE-214에 감염시킨 후 24시간째에 total RNA를 추출하였고 이로부터 cDNA를 합성하였다. PCR을 수행하여 NV의 full ORF 부분을 증폭한 이후 pEGFP-N1 vector에 cloning하였다. 이와 같이 준비한 pEGFP-NV plasmid를 electroporator를 사용하여 CHSE-214 cell에 transfection시킨 후 48시간 째에 NV의 발현을 confocal microscopy 및 western blotting으로 확인하였다.

결과 및 요약

IHNV NV 유전자가 transfection된 CHSE-214 세포를 confocal microscope로 관찰한 결과, pEGFP vector만 transfection된 세포의 경우 형광이 세포 전체에 퍼져 존재한 반면, pEGFP-NV로 transfection된 세포의 경우 세포질에서도 형광이 존재하지만 대부분의 형광이 핵에 존재함이 관찰되었다. 이를 재확인하기 위하여 pEGFP-NV가 transfection된 세포에서 핵과 cytoplasm을 분리한 다음 EGFP 항체를 사용한 western blotting을 수행하였다. 그 결과 EGFP는 세포질에서만 존재하는 반면 NV는 핵과 세포질에 모두 존재함이 확인 되었다.

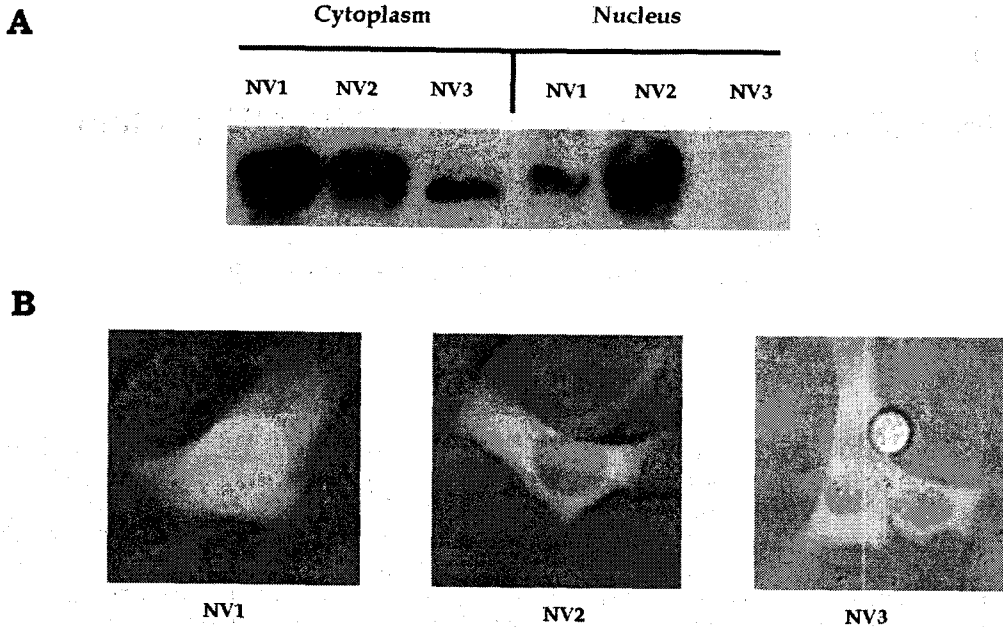


Figure 5. Construction of NV deletion mutants and Western blotting analyses of Intracellular fractionation of NV deletion mutants. A. Western blotting with the anti-GFP B. Confocal microscopic images

계속된 실험에서, 그러면 NV가 가지고 있는 아미노산 서열 중 어떤 부분이 NV의 핵으로의 이동에 관여하는 지를 확인하기 위하여 여러 가지 deletion mutants를 제작하였고 앞에서 언급한 것과 같은 방법으로 분석하였다. 그 결과 NV가 가지고 있는 아미노산 서열 중 N-terminal 쪽에 위치하는 부분 (aa 18~35)이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 하지만 우리는 이들 부분에 지금까지 밝혀진 일반적인 Nuclear localization signal (NLS)를 발견할 수 없었다. 이것은 아마도 NV가 기존의 NLS와는 다른 새로운 NLS를 가지고 있다는 것을 의미한다. 이 부분을 기존에 보고된 non-classic NLS와 비교한 결과 Frog의 nucleoplasmin과 Herpes simplex virus의 ICP27의 NLS와 유사성이 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 IHNV NV 단백질이 핵으로 이동함을 확인할 수 있었는데 본 연구 결과는 NV의 역할을 밝히는 데에 중요한 자료를 제공하여 주며 한편으로 IHNV를 비롯한 rhabdovirus의 생활사를 보다 정확하게 이해할 수 있는 자료라고 판단된다.

참고문헌

Chiou P.P., *et al.* (2000). Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures. *J. Virol.* 74: 7619-7627.

- Kurath G., and J. A. Leong. (1985) Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein. *J. Virol.* 53: 462-468.
- Schutze, H., *et al.* (1996) Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses, viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 77: 1259-1263
- Thoulouze M.I., *et al.* (2004) Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J. Virol.* 78: 4098-4107.
- Biacchesi, S., *et al.* (2000) Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J. Virol.* 74: 11247-11253.