

Human cytomegalovirus 증식에 미치는 cAMP의 영향

지용훈¹ · 윤주현¹ · 이찬희^{1,2*}

¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과, ²서울대학교 분자미생물학 연구센터

Human cytomegalovirus(HCMV)의 immediate early(IE) 유전자의 promoter/enhancer 부위에 cAMP response element가 있다는 것으로부터 cAMP가 HCMV의 증식에 관여할 것이라고 생각할 수 있다. 이러한 가능성을 알아보기 위해 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate(BrA)와 papaverine 같은 세포내 cAMP 농도를 변화시키는 약제를 사용하여 HCMV의 증식, DNA 합성 및 IE 유전자 발현에 대한 영향을 알아 보았다. HCMV 증식과 DNA 합성은 papaverine에 의해 억제된 반면, BrA는 HCMV의 증식에는 큰 영향을 주지 않았고 DNA 합성은 오히려 촉진시키는 것을 알 수 있었다. HCMV IE promoter에 의해 작동되는 CAT 유전자를 함유한 plasmid pCMVIE/CAT을 세포내로 transfection 시켰을 때, papaverine을 처리한 세포에서는 CAT 효소 활성도가 감소한 반면 BrA를 처리한 세포에서는 증가하였다. HCMV에 감수성이 없는 HeLa 세포에서는 CAT 활성도가 감수성 세포인 HEL 세포에서 보다 높게 나타난 반면, Vero 세포에서는 낮게 나타났다. 이들 비감수성 세포에서의 CAT 활성도는 BrA를 처리하여 주었을 때 모두 증가하였다. 이상과 같은 결과로부터 cAMP는 HCMV 증식과 IE 유전자 발현에 어느 정도 관여한다는 것을 알 수 있다.

KEY WORDS □ human cytomegalovirus, cAMP, major IE gene

Human cytomegalovirus(HCMV)의 유전자 발현은 시기에 따라 immediate early(IE), early(E) 그리고 late(L)로 나눌 수 있다. 이 중에서 IE 유전자 산물은 이후의 유전자 발현에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(3, 13, 16). 따라서 IE 유전자에 대한 연구는 HCMV의 다른 어떤 유전자에 비해 많이 수행되었고, 특히 IE 유전자의 promoter/enhancer 부위에는 다양한 조절인자가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(2, 4, 5, 20, 22). HCMV의 IE promoter/enhancer 부위에는 모두 nuclear factor (NF) I, NF κ B와 activator protein(AP)-1이 결합할 수 있는 부위가 존재한다고 알려져 있으며(4), 특히 cyclic AMP response element(CRE) 부위가 HCMV의 경우에 5군데가 존재하는 것으로 알려져 있다. Cyclic AMP는 *E. coli*와 같은 원핵세포의 에너지 대사에서부터 고등 포유동물의 glycogen 분해에 이르기까지 다양하게 작용하는 것으로 알려져 있으며(1, 12, 18, 23), cAMP-수용체 단백질이 결합하는 부위는 8개의 일정한 염기서열(TGACGTCA)로 쥐의 somatostatin 유전자(11)와 HCMV IE 유전자(22) 등에 존재하는 것으로 밝혀져 있다.

최근까지 HCMV와 cAMP의 관련성에 대한 연구는 대부분 CRE의 존재와 구조를 밝히고, CRE를 cloning하여 *in vitro*에서 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)와 같은 외부 유전자에 붙여주었을 때의 enhancing activity를 보는 것에 중점을 두어 왔다(8, 19). 아직 cAMP 농도를 변화시켜 주었을 때

HCMV의 증식이 증가하는지 또는 감소하는지에 대한 상세한 연구는 되어 있지 않으며, 나아가 이에 뒤따르는 현상에 대한 연구도 거의 없는 실정이다. 한편 cAMP가 감수성 있는 숙주세포에서의 HCMV 증식에 영향을 준다면 감수성 없는 세포에서는 어떤 영향을 주는지에 대해서 알아보는 것도 흥미로운 일이라 생각된다. 본 연구는 cAMP의 농도를 변화시켜 주었을 때 HCMV 증식과 IE 유전자 발현에 어떠한 변화가 나타나는지를 알아보는 것을 목적으로 하고 있다. 즉, 바이러스의 증식을 바이러스의 유전자 발현의 측면에서만 보는 것이 아니라 바이러스 감염에 따른 세포의 변화를 본다는 점에서 중요성을 찾을 수 있다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

HCMV 증식을 위한 감수성 세포로는 human embryo lung(HEL) 세포를 사용하였고, 비감수성 세포로는 HeLa와 Vero 세포를 사용하였다. 세포성장에는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10%의 fetal calf serum(FCS)과 0.22%의 NaHCO₃를 첨가한 성장배지를 이용하여 75 cm² 세포배양용 플라스크에서 배양하였다. 완전히 자란 세포는 세포단층(cell monolayer)을 유지하기 위하여 2%의 FCS가 함유된 유지배지를 사용하였다.

약제

본 연구에 사용한 약품 중 papaverine은 Eli Lilly (Indianapolis, IN, U.S.A.)에서 구입한 것으로 30 mg/ml의 주사용액으로 된 것이다. Cyclic AMP의 유사체인 BrA는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다.

바이러스

모든 실험에 사용된 바이러스는 HCMV strain AD 169이며, 이 바이러스는 University of Texas Medical Branch(Galveston, TX, U.S.A.)의 Dr. T. Albrecht로부터 얻었다. HCMV stock을 얻는 방법과 plaque assay에 의한 정량방법은 Lee와 Albrecht(9)의 방법을 따랐다.

세포 독성 측정

실험에 이용된 약제들의 독성은 trypan blue exclusion 방법에 의해 세포의 생존율을 결정함으로써 알아보았다. 세포배양용 35 mm 페트리디쉬에서 완전히 자란 HEL 세포단층에 여러 농도의 약제를 처리한지 96시간 후에 트립신을 처리하여 세포를 단세포화하고 0.4% trypan blue(Sigma Chemical Co.)에 1:10 희석하였다. 살아있는 세포는 trypan blue를 흡수하지 않으므로 현미경하에서 밝은 광채를 띠는 반면 죽은 세포는 세포막의 파괴에 의해 trypan blue가 침투되므로 파란색으로 보이게 되는 원리를 이용하여 현미경하에서 haemocytometer로 생존세포의 수를 세었다.

Plasmid

본 연구에 이용된 plasmid인 pCMVIE/CAT는 HCMV IE promoter에 CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 유전자가 결합된 것을 plasmid pUC18에 접합시킨 것으로, 이 plasmid는 University of California Davis Medical Center(Sacramento, CA, U.S.A.)의 Dr. P. Barry로부터 얻었다. Plasmid를 증폭하기 위해서 *E. coli* JM 109에 형질전환 시켰으며, 여기서 얻은 형질전환균으로 부터의 DNA 추출은 Sambrook 등(17)의 alkaline lysis 방법을 변형하여 사용하였다.

Transfection과 CAT 분석

Plasmid pCMVIE/CAT의 HEL 세포로의 도입은 Staprans 등(19)의 monolayer transfection 방법을 변형하여 수행하였다. Transfection하기 72~96시간 전에 세포를 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 이 되도록 60 mm 페트리디쉬에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 대기에서 배양하였다. 이렇게 얻은 왕성히 자라는 세포에 calcium phosphate-DNA 응집체를 첨가한지 한 시간 후에 calcium phosphate-DNA 응집체를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 뒤 새로이 배지를 첨가하였다. 그후 48시간 뒤에 세포를 모아서 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)의 효소 활성도를 측정하였다.

CAT 분석은 Hruby 등(6)의 방법을 이용하였다. Plasmid가 transfection된 HEL 세포단층을 트립신 처리한 뒤 원심분리한 후 세포를 0.1 ml의 0.25 M

Tris-HCl(pH 7.5)로 재현탁하였다. 액체질소에 3~4 회 얼림과 녹임을 반복하여 세포를 파괴시키고 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 효소 활성은 Fluoreporter FAST CAT Gene Fusion Detection Kit (Molecular Probes, OR, U.S.A.)를 사용하여 측정하였으며 동봉된 방법에 의해 마련된 시료는 silica gel thin-layer chromatography 방법에 의해 전개시켰다. 결과를 분석하기 위하여 자외선이 조사되는 곳에서 형광을 관찰하였으며 정량분석을 위해 각 spot을 끊어서 methanol에 녹인 것을 490 nm로 자극시켰을 때, 510 nm에서 발산되는 형광도를 fluorescence spectrophotometer(Hitachi, Tokyo, Japan, model F-3000)로 측정하였다.

DNA 합성

바이러스에 감염된 세포에서 바이러스 DNA 합성에 대한 약제들의 영향을 알아보기 위해서 HEL 세포를 35 mm 페트리디쉬에 배양하였다. 세포가 단층을 형성하면 바이러스를 MOI가 세포당 3~5 pfu(plaque forming unit)가 되게 감염시키고 약제가 함유된 유지매지를 첨가하였다. 약제 첨가 48시간 후 동일 농도의 약제가 함유된 매지로 갈아주고 ³H-thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL, U.S.A., specific activity=25 Ci/mmol)을 최종 농도가 5 μ Ci/ml이 되게 첨가하였다. 바이러스 감염 96시간에 세포를 -20°C에 얼림으로써 반응을 멈추었다. 이를 녹인 것에 1 ml의 매지당 0.06 ml의 protease(type XIV, 1% in 1XSSC), 0.03 ml sodium sarcosine(2% in 0.1XSSC)과 0.03 ml EDTA(0.02 M)를 넣어 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 위의 방법으로 얻은 lysate 0.1 ml을 취하여 Whatman No.3 filter paper에 점적한 뒤 5% trichloroacetic acid로 세 차례에 걸쳐 침전시킨 뒤 방사능을 liquid scintillation counter(Beckman, Fullerton, CA, U.S.A., model LS 5000TA)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

세포 독성 효과

바이러스의 증식에는 살아 있는 숙주세포가 필수적이므로 약제가 세포의 생존에 영향을 미친다면 바이러스의 분석에 정확을 기할 수 없게 된다. 따라서 약제들을 사용함에 있어 약제가 세포의 생존력에 영향을 주지 않는 최고의 농도(highest nontoxic concentration: HNC)를 먼저 결정하였다. 본 실험에는 papaverine과 BrA를 이용하여 약제 처리 후 4일째의 생존세포를 구하여 각 농도에서의 생존 세포수를 약제가 함유되지 않은 매지에서의 생존 세포수로 나누어 백분율로 도식화 하였다(Fig. 1). 이 실험의 결과에서 papaverine과 BrA의 HNC는 대략 10 μ M과 300 μ M임을 알 수 있다.

HCMV 증식에 대한 cAMP의 영향

본 실험에 사용된 약제들의 HCMV 증식에 대한

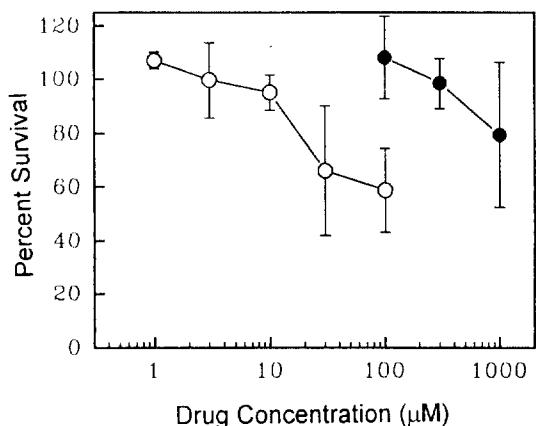


Fig. 1. Effect of papaverine and 8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (BrA) on the viability of stationary human embryo lung cells.

HEL cell monolayers grown in 35 mm petri dishes were fed with EMEM containing various concentrations of drug for 96 hours with changing medium after 48 hours. After trypsinization, viable cells were identified by trypan blue exclusion assay.

(○), papaverine; (●), BrA.

효과를 조사하기 위해 배양 면적이 25 cm²인 세포배양용 플라스크에서 완전히 자란 HEL 세포에 바이러스를 MOI가 약 3.2 pfu/세포가 되도록 감염시킨 뒤 원하는 농도의 약제가 함유된 유지배지를 첨가하고 감염 이틀 후 배지를 동일 농도의 약제가 함유된 신선한 유지배지로 갈아주었다. 감염 96시간째 세포를 -65°C에 얼림으로써 반응을 멈추고 plaque assay에 의해 감염성 있는 바이러스의 수를 계산하였다. Table 1에서 알 수 있듯이, 약제가 처리되지 않은 경우에 비해 papaverine 3 μM에서 13배, 10 μM에서는 700배의 HCMV 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 반면에 BrA는 HNC 이하의 농도에서 바이러스 증식에 별 다른 억제 효과를 보이지 않았다.

DNA 합성에 대한 cAMP의 효과

바이러스가 감염되지 않은 정상세포에서의 DNA 합성에 대한 cAMP의 영향은 Table 2에 나타난 바와 같다. Papaverine을 3 μM과 10 μM 처리해 준 세포에서는 정상세포에 비해 DNA 합성이 각각 61%와 19%로 감소하였으며, BrA를 처리해 주었을 때에는 100 μM과 300 μM에서 각각 52%와 38%의 DNA 합성율을 보였다. 이상의 결과로 papaverine과 BrA는 약제의 농도가 증가함에 따라 세포성 DNA 합성 억제 효과도 증가하는 것을 알 수 있다. HCMV가 감염된 세포에서의 DNA 합성에 대한 cAMP의 영향을 알아보기 위해 35 mm 페트리디쉬에서 완전히 자란 세포에 바이러스를 감염시킨 후 원하는 농도의 약제가 함유된 배지를 첨가하였다. 바이러스 감염 48시간

Table 1. Effect of cAMP modulating drugs on infectious HCMV yields

Drug	Concentration (μM)	HCMV yields ± SD ^a (pfu/ml)	Fold inhibition ^b
None		(6.2 ± 1.5) × 10 ⁶	
Papaverine	3	(4.7 ± 1.3) × 10 ⁵	13
	10	(8.9 ± 0.8) × 10 ³	700
8-Bromoadenosine	100	(5.8 ± 1.2) × 10 ⁶	1.1
3',5'-cyclic monophosphate	300	(6.2 ± 1.9) × 10 ⁶	1.0

Confluent HEL cells grown in 25 cm² flasks were infected with HCMV (strain AD169) at MOI of 3.2 pfu/cell. Maintenance media containing the selected concentrations of drug were added at 0 hr postinfection (p.i.). Media and drugs were replaced at 48 hr p.i. and the virus yields were determined by plaque assay at 96 hr p.i.

^a Standard deviation

^b Fold inhibition

$$= \frac{\text{virus yields in the absence of drugs}}{\text{virus yields in the presence of drugs}}$$

Table 2. Effect of cyclic AMP modulating drugs on the synthesis of DNA in HEL cell

Drugs	Concentration (μM)	CPM ± SD ^a	Percent of control ^b
None		13991 ± 396	100
Papaverine	3	8538 ± 780	61
	10	2642 ± 98	19
8-Bromoadenosine	100	7256 ± 15	52
3',5'-cyclic monophosphate	300	3948 ± 95	38

HEL cells were grown to a confluency in 35 mm petri dishes. Selected concentrations of the drugs in maintenance media were added to HEL cell cultures two days after confluency. Media and drugs were replaced 48 hr after the drug treatment. At 48 hr drug treatment, a small volume of concentrated ³H-thymidine (Amersham, specific activity = 25 Ci/mmol) was added to the medium supporting the cells to make a final concentration of 5 μCi/ml. Labeling was stopped at 96 hr after the drug treatment.

^a Standard deviation

^b Percent of control

$$= \frac{\text{CPM in the presence of drugs}}{\text{CPM in the absence of drugs}} \times 100$$

후에 ³H-thymidine을 최종 농도가 5 μCi/ml이 되도록 첨가해주고, 감염 96시간 후에 방사능을 측정하였다(Table 3). Papaverine의 경우에 3 μM과 10 μM에서는 약제가 처리되지 않은 세포에서 합성된 DNA 양과 비교해서 74%와 43%로 DNA 합성이 감소한

Table 3. Effect of cyclic AMP modulating drugs on the synthesis of DNA in HEL cells infected with HCMV

Drugs	Concentration (μM)	CPM \pm SD	Percent of control
None		9758 \pm 85	100
Papaverine	3	7246 \pm 162	74
	10	4214 \pm 63	43
8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate	100	18665 \pm 14	191
	300	17731 \pm 16	182

HEL cells grown in 35 mm petri dishes were infected with HCMV (strain AD169) at MOI of 3~5 pfu/cell. Media containing the selected concentrations of the drugs were added to the dishes at 0 hr p.i. and replaced at 48 hr p.i. At 48 hr p.i., a small volume of concentrated ^3H -thymidine (specific activity=25 Ci/mmol) was added to the medium supporting the infected cells to make a final concentration of 5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Labeling was stopped at 96 hr p.i.

반면, BrA를 처리하였을 때에는 아무런 약제가 첨가되지 않은 경우에 비해 DNA 합성이 100 μM 과 300 μM 에서 각각 91%와 82% 증가되었다.

이상과 같이 papaverine은 농도에 따른 바이러스 증식 억제 효과를 나타낸 반면에 BrA는 바이러스의 증식을 뚜렷하게 억제하지도 촉진시키지도 않음을 알 수 있었다. 이것은 HCMV에 감염된 세포내의 DNA 합성에 대한 결과와 상이하다. 즉, 바이러스에 감염된 세포에 BrA를 처리하여 주었을 때 전체 DNA의 합성이 증가됨을 보였다. 그러나 BrA가 HCMV 증식을 촉진시키지 않았기 때문에 이 결과는 다음과 같이 해석해 볼 수 있다. 첫째, 합성된 DNA의 양이 많더라도 만들어지는 capsid 단백질의 양이 일정할 경우 감염성 있는 바이러스가 크게 증가하지 않을 것이다. 둘째, 합성된 DNA가 정상적인 형태가 아니라 결함된 형태(defective genome)이면 감염성 있는 바이러스의 수는 증가하지 않을 것이다. 한편 HCMV가 감염된 세포에서의 DNA의 합성이 감염이 되지 않은 세포에서 합성되는 DNA의 양보다 적은데 이것은 다음과 같이 설명할 수 있을 것이다. HCMV는 감염 초기 숙주세포의 DNA 합성을 촉진시키나, 감염 후기 바이러스 감염 48시간 이후에는 세포성 DNA 합성을 억제시키게 된다(21). 그러나, 이러한 현상은 BrA로 세포내 cAMP 농도를 증가시켜 주었을 때 바이러스 DNA 합성이 선택적으로 촉진되기 때문에 약제가 처리되지 않은 세포에서 합성된 DNA 양보다 약제가 처리된 세포에서 보다 많이 이루어진 것으로 생각해 볼 수 있다.

HCMV IE 유전자 발현에 대한 cAMP의 영향

이상의 실험에서 cAMP는 HCMV 증식 및 DNA 합성에 관여하는 것을 알 수 있다. HCMV 증식에

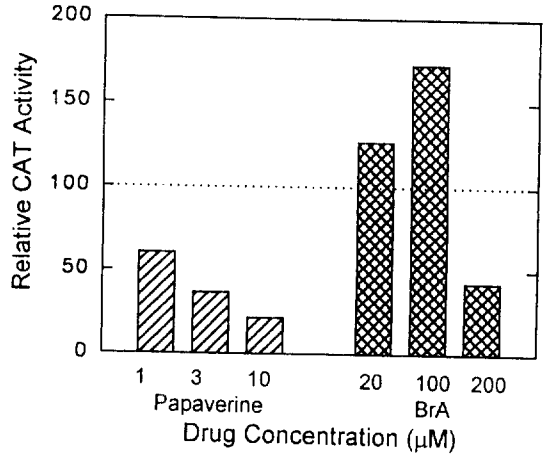


Fig. 2. Effect of cAMP modulating drugs on the expression of pCMVIE/CAT in human embryo lung cells.

The histograms illustrate the results of transient CAT expression assays with various concentrations of drugs. Each bar represents the percent conversion of chloramphenicol to acetylated forms by CAT in the presence of drug relative to that in the absence of drug.

가장 중요한 역할을 하는 유전자는 IE 유전자이므로 다음으로 cAMP가 IE 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 이를 위해 pCMVIE/CAT plasmid를 transfection시킨 HEL 세포에 papaverine 또는 BrA를 처리하고 48시간 후에 CAT 효소 활성도를 측정하여 약제를 처리하지 않은 HEL 세포에서의 CAT 효소 활성도를 100%로 하였을 때의 상대적인 효소 활성도로 나타내었다(Fig. 2). Papaverine의 최종 농도가 1 μM , 3 μM 그리고 10 μM 가 되게 첨가하여 주었을 때 CAT 효소 활성도는 첨가하지 않은 경우에 비해 각각 60%, 36%, 그리고 21%로 낮아지는 것으로 보아 papaverine은 HCMV IE promoter의 활성을 억제하며 이러한 억제효과는 papaverine의 농도에 비례하는 것을 알 수 있다. 반면에 BrA를 처리하여 주었을 때에는 20 μM , 100 μM 에서는 처리하지 않았을 경우에 비해 각각 127%와 173%로 CAT 효소 활성도가 증가하였으나, 200 μM 에서는 42%로 감소하였다. Papaverine 처리에 의해 CAT 효소 활성도가 papaverine을 처리해 주지 않은 경우보다 더 낮게 나타난 것은 papaverine이 HCMV가 감염된 세포에서의 cAMP 농도 증가를 억제시킨다는 보고(9)에 의해 설명될 수 있다. 또한 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 것으로 알려진 BrA를 처리하여 주었을 때 CAT 효소 활성도가 증가하였다는 실험 결과는 HCMV의 IE 유전자 발현에 cAMP가 촉진 효과를 나타낸다는 것을 시사한다. 그러나 너무 높은 농도의 cAMP는 HCMV IE 유전자의 발현을 오히려

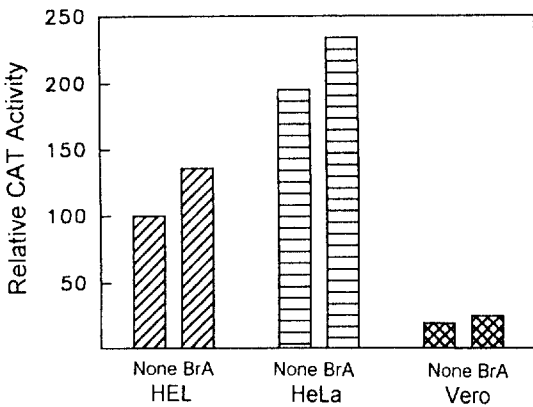


Fig. 3. Expression of pCMVIE/CAT in various cells. The histograms illustrate the results of transient CAT expression assays. Each bar represents the percent conversion of chloramphenicol to acetylated forms by CAT relative to that in the absence of drug in HEL cells.

억제시키는 것 같다. 이는 200 μ M의 높은 농도의 BrA를 처리하여 주었을 때에는 오히려 CAT 효소의 활성도가 낮게 나타난 본 실험 결과로 추측할 수 있으며, 또한 본 논문에는 나타내지 않았지만 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 forskolin을 처리하였을 때에도 CAT 효소 활성도가 낮아지는 것으로도 뒷받침이 될 수 있다. 이 점에 대해서는 현재 보다 자세한 실험을 하는 중에 있다.

비감수성 세포에서 HCMV IE 유전자 발현에 대한 cAMP의 영향

HCMV가 증식할 수 없는 세포에 plasmid를 transfection 시켰을 때 과연 유전자의 발현이 일어나는지 또는 cAMP에 의하여 유전자 발현이 촉진 억제되는지를 알아보기 위하여 사람 세포인 HeLa와 원숭이 세포인 Vero 세포를 이용하였다(Fig. 3). HeLa 세포에서의 CAT 효소의 활성도는 HEL 세포에 비해 95% 증가하였고 여기에 BrA 100 μ M이 처리된 경우에는 134%의 CAT 효소 활성도의 증가를 보였다. 반면에 Vero 세포에서 HCMV IE 유전자 발현은 HeLa 세포와 비교해 볼 때 매우 낮게(19.5%) 나타났다. 그러나, BrA 100 μ M을 처리하였을 때에는 CAT 효소 활성도가 HEL 세포에 비해 25%로 BrA가 처리되지 않은 세포와 비교하여 볼 때 약간 증가(19.5%에서 25%로)함을 볼 수 있었다.

HCMV 감염에 대해 감수성이 없는 HeLa 세포에서의 HCMV IE 유전자 발현은 감수성 있는 HEL 세포에서의 IE 유전자 발현에 비해 높게 나타났는데 그 이유는 다음과 같이 생각하여 볼 수 있다. HEL 세포는 사람의 섬유아세포가 기원인 반면에 HeLa 세포는 사람의 자궁암 세포가 기원인 것으로 알려져

있으며, HCMV가 자궁암 조직에서 검출되었다는 보고도 있다(10). 암세포가 기원인 HeLa 세포는 지속적으로 증식을 할 수 있으므로 세포내 growth factor나 transcription factor의 양이 정상세포에 존재하는 양에 비해 많이 있을 것이다. Ghazal 등(5)의 보고에 의하면 HeLa 세포의 transcription factor가 HCMV IE 유전자의 promoter/enhancer 부위에 존재하는 18-bp repeat와 19-bp repeat에 결합하며, IE 유전자의 promoter/enhancer 부위가 포함되어 있는 plasmid인 pCMV(-91)CAT와 pCMV(-65)CAT을 HeLa 세포에 각각 transfection 시켰을 때 IE 유전자가 발현된다고 하였다. 따라서 CRE가 존재하는 19-bp repeat에 transcription factor가 지속적으로 결합하여 HCMV IE 유전자 발현에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 한편, Vero 세포에서의 HCMV IE 유전자 발현은 HEL 세포에서 나타나는 IE 유전자 발현에 비해 낮은 것으로 나타났는데 이것은 IE promoter/enhancer 부위에 결합하는 핵 단백질이 세포에 대한 특이성을 지니기 때문일 것으로 생각된다. 그러나, cAMP가 세포내에 일정량 존재하고 있기에 HCMV IE 유전자 발현이 소량이나마 나타난 것 같다. 또한 Nowlin 등(15)의 보고에 의하면 HCMV는 human foreskin fibroblast 세포와 Vero 세포에 동등하게 흡착을 하나, 이후 세포막 투과나 IE 유전자 발현이 Vero 세포에서 낮은 것으로 보고되었는데 이 보고와 본 실험 결과가 유사함을 알 수 있다.

이상의 결과들로부터 cAMP가 HCMV IE 유전자의 발현에 증감적인 역할을 하지만, cAMP 농도의 증가는 바이러스의 증식에는 큰 영향이 없으며, 비감수성 세포인 HeLa 세포에서의 HCMV IE 유전자 발현은 감수성 세포인 HEL 세포보다 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 이러한 실험 결과들은 HCMV IE 유전자 발현만이 바이러스의 증식 여부를 결정지어 주는 인자는 아니라는 것을 시사한다. 아마도 IE 유전자 발현에서 전기(E) 유전자 발현으로의 전환 또는 후기(L) 유전자 발현으로의 전환이 더욱 중요할지 모르며, 따라서 이 분야에 대한 앞으로의 연구가 더 필요하다. 또한, cAMP의 농도는 다른 이차전령물질 또는 signal transduction 인자들에 의해서도 조절을 받기 때문에(7, 14), 세포내의 Ca^{2+} , inositol lipid, diacylglycerol, protein kinase 등의 농도나 활성에 변화를 주었을 때 HCMV IE 유전자의 발현이 어떻게 영향을 받는지 알아보는 것도 가능할 것이다. 한편 비감수성세포에서 어느 정도의 HCMV IE 유전자 발현이 일어나는데 비해 감염성바이러스의 생성이 일어나지 않는 원인을 규명하는 것도 바이러스의 증식에 필요한 인자를 규명하는데 일익을 담당할 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반기초연구 지원비

(911-0407-080-2)와 한국과학재단의 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구소) 지원 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. **Andrisani, O.M., D.A. Plot, Z. Zhu and J.E. Dixon**, 1988. Three sequence-specific DNA-protein complexes are formed with the same promoter element essential for expression of the rat somatostatin gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1947-1956.
2. **Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Hasler, B. Fleckenstein and W. Schaffner**, 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530.
3. **Chang, C.P., C.L. Malone and M.F. Stinski**, 1989. A human cytomegalovirus early gene has three inducible promoters that are regulated differentially at various times after infection. *J. Virol.* **63**, 281-290.
4. **Chang, Y.N., S. Crawford, J. Stall, D.R. Rawlins, K.T. Jeang and G.S. Hayward**, 1990. The palindromic series I repeats in the simian cytomegalovirus major immediate-early promoter behave as both strong basal enhancers and cyclic AMP response elements. *J. Virol.* **64**, 264-277.
5. **Ghazal, P., H. Lubon, B. Fleckenstein and L. Hennighausen**, 1988. Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3658-3662.
6. **Hruby, D.E., J.M. Brinkley, H.C. Kang, R.P. Haugland, S.L. Young and M.H. Melner**, 1990. Use of a fluorescent chloramphenicol derivative as a substrate for CAT assays. *Biotechniques* **8**(2).
7. **Hunninghake, G.W., M.M. Monick, B. Liu and M. F. Stinski**, 1989. The promoter-regulatory region of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains functional cyclic AMP-response elements. *J. Virol.* **63**, 3026-3033.
8. **Klucher, K.M., D.K. Rabert and D.H. Spector**, 1989. Sequences in the human cytomegalovirus 2.7-kilobase RNA promoter which mediate its regulation as an early gene. *J. Virol.* **63**, 5334-5343.
9. **Lee, C.H. and T. Albrecht**, 1987. Cyclic nucleotide responses to cytomegalovirus infection: Partial correlation with inhibition of CMV yields by papaverine, p. 382. *In* Abstracts of the twelfth international herpesvirus workshop, July 30-August 4, Philadelphia.
10. **Melnick, J.L., R. Lewis, I. Wimberly, R.H. Kaufman and E. Adam**, 1978. Association of cytomegalovirus (CMV) infection with cervical cancer: Isolation of CMV from cell cultures derived from cervical biopsy. *Intervirology* **10**, 115-119.
11. **Montminy, M.R., K.A. Sevarino, J.A. Wagner, G. Mandel and R.H. Goodman**, 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 6682-6686.
12. **Montminy, M.R. and L.M. Bilezikjian**, 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP-response element of the somatostatin gene. *Nature* (London) **328**, 175-178.
13. **Nelson, J.A., C. Reynolds-Kohler and B.A. Smith**, 1987. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4125-4129.
14. **Niller, H.H. and L. Hennighausen**, 1990. Phytohemagglutinin-induced activity of cyclic AMP (cAMP) response elements from cytomegalovirus is reduced by cyclosporine and synergistically enhanced by cAMP. *J. Virol.* **64**, 2388-2391.
15. **Nowlin, D.M., N.R. Cooper and T. Compton**, 1991. Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J. Virol.* **65**, 3114-3121.
16. **Pizzorno, M.C., P. O'Hare, L. Sha, R.L. LaFemina and G.S. Hayward**, 1988. Trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **62**, 1167-1179.
17. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis**, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
18. **Silver, B.J., J.A. Bokar, J.B. Virgin, E.A. Vallen, A. Milsted and J.J. Nilson**, 1987. Cyclic AMP regulation of the human glycoprotein hormone alpha subunit gene is mediated by an 18-base-pair element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 2198-2202.
19. **Staprans, S.I., D.K. Rabert and D.H. Spector**, 1988. Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J. Virol.* **62**, 3463-3473.
20. **Stinski, M.F. and T.J. Roehr**, 1985. Activation of the major immediate early gene of human cytomegalovirus by cis-acting elements in the promoter-regulatory sequence and by virus-specific trans-acting components. *J. Virol.* **55**, 431-441.
21. **St. Jeor, S.C., T.B. Albrecht, F.D. Funk and F. Rapp**, 1974. Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus. *J. Virol.* **13**, 353-362.
22. **Thomsen, D.R., R.M. Stenberg, W.F. Goins and M.F. Stinski**, 1984. Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 659-663.
23. **Weber, I.T., K. Tahio, K. Titani and T.A. Steitz**, 1982. The cAMP-binding domains of the regulatory

subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolite gene activator protein are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7679-7683.

(Received November 10, 1992)

(Accepted January 8, 1993)

ABSTRACT: Effect of cAMP on the Replication of Human Cytomegalovirus

Jee, Yong-Hoon¹, Joo-Hyun Yoon¹, and Chan-Hee Lee^{1,2*} (¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and ²Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Since the promoter/enhancer region of the major immediate early (IE) gene of human cytomegalovirus (HCMV) contains the cyclic AMP (cAMP) response element (CRE) consensus sequence, it was reasonable to hypothesize that cAMP might affect HCMV replication. Cyclic AMP modulating drugs such as 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate (BrA), and papaverine were used to affect the intracellular levels of cAMP, and the effects of the drugs on HCMV replication were studied. While papaverine effectively inhibited HCMV multiplication and DNA synthesis, BrA exerted little effect on the production of infectious HCMV yields. The synthesis of DNA in HCMV-infected cells appeared to be stimulated by BrA. In order to understand the effect of cAMP on the expression of HCMV major IE gene, plasmid (pCMVIE/CAT) containing a reporter gene driven by HCMV IE promoter was transfected into either permissive human embryo lung (HEL) cells or nonpermissive cells. Papaverine, which has been reported to block the HCMV-induced increase in cAMP, reduced the expression of pCMVIE/CAT in permissive HEL cells. Treatment of transfected cells with BrA increased the expression of HCMV major IE promoter not only in HEL cells, but also in nonpermissive HeLa and Vero cells. Therefore, it seems that the expression of HCMV major IE gene is regulated by cAMP.