

Human Cytomegalovirus 유전자 발현에 대한 Cyclic GMP의 영향

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, 충북대학교 유전공학연구소

윤주현 · 이규철 · 송병학 · 김영진 · 이찬희*

=Abstract=

Effect of Cyclic GMP on Human Cytomegalovirus Gene Expression

Joo-Hyun Yoon, Gyu-Cheol Lee, Byung-Hak Song, Young-Jin Kim and Chan-Hee Lee*

Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, and Research Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea

The relationship between second messenger cGMP and human cytomegalovirus (HCMV) replication was investigated. First, the intracellular level of cGMP ([cGMP]_i) in HCMV-infected cells was measured. The [cGMP]_i increased at early times after HCMV infection, reached maximum level at 12 hr and returned to basal level at 24 hr after virus infection, while [cGMP]_i in mock-infected cells remained relatively unchanged. Increasing [cGMP]_i resulted in enhanced transcription of HCMV major immediate early gene. For early gene expression, cGMP had varying effect. Expression of 1.2 kb RNA decreased and 2.2 kb RNA increased with increasing cGMP, while 2.7 kb RNA gene expression was not affected. HCMV early genes are regulated by immediate early gene, and the effect of cGMP on the regulatory effect of major immediate early gene on early genes was investigated. In the absence of cGMP, major immediate early gene repressed 2.7 kb RNA gene expression, while 1.2 kb RNA and 2.2 kb RNA early genes were not significantly affected. In the presence of 1 μM cGMP, however, major immediate early gene stimulated the expression of three early genes.

Key Words: Human cytomegalovirus, cGMP, Gene expression

서 론

Human cytomegalovirus (HCMV)는 herpesvirus의 일종으로 태어나 신생아, 기관이식 환자 등에 특징적인 질병을 일으킨다. HCMV는 이중가닥의 DNA를 genome으로 가지며, 이는 230 kbp로 구성되어 있고 최근의 DNA 염기서열 분석결과에 의하면 적어도 203개의 open reading frame을 가지고

있는 것으로 알려져 있다 [3]. HCMV의 유전자 발현은 그 시기에 따라 즉시초기 (immediate early; IE), 초기 (early; E), 그리고 후기 (late; L) 유전자로 구분된다. 즉시초기 유전자는 초기 유전자 발현을 촉진하며 여러가지 세포성 유전자 또는 다른 바이러스의 유전자 발현을 촉진한다. 초기 유전자의 주된 기능은 바이러스 DNA 복제와 관련되며 DNA polymerase, ribonucleoside reductase, 그리고 dsDNA binding protein 등을 포함한다. 초기

접수 : 1999년 11월 15일, 논문게재확정 : 1999년 12월 21일

*; Corresponding author: Chan Hee Lee, Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, San 48 Gaeshindong, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea. Tel: (0431) 261-2304, Fax: (0431) 273-2451, e-mail: chlee@cbucc.chungbuk.ac.kr

유전자 발현에 따라 바이러스 DNA의 복제가 시작되면 후기 유전자 발현이 일어나게 된다. 후기 유전자는 주로 구조단백질을 만드는데 관여한다. 이상과 같은 HCMV 유전자의 발현은 정교한 조절을 받는데 가장 많은 연구가 되어 있는 유전자는 major immediate early (MIE) 유전자이다.

MIE 유전자는 72 kd 단백질을 암호화하는 MIE1 유전자와 86, 55 kd 단백질을 암호화하는 MIE2 유전자로 구분되는데 이들은 공통의 promoter (MIEP)에 의해 조절받는다. MIEP은 조절부위 I과 조절부위 II로 나뉘어 여기에는 다양한 cis-acting element들이 존재한다. 조절부위 I에는 13개의 염기쌍으로 된 반복구조를 가지고, 조절부위 II에는 16, 18, 19, 21 염기쌍의 반복구조 같은 다양한 조절인자가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [2, 4, 5, 23, 24]. 조절부위 I의 13 염기쌍 반복구조는 nuclear factor (NF) 1/CAAT binding protein (CBP) 결합부위와 중첩되어 있다. 조절부위 II의 18 염기쌍 반복구조는 NF κ B 결합부위가 결합할 수 있는 부위가 존재하고, 21 염기쌍 반복구조에는 SP-1 결합부위가 존재한다. 19 염기쌍 반복구조는 cAMP-response element (CRE)와 ATF 결합부위를 포함하고 있다 [7, 20]. 특히, CRE는 모든 종류의 CMV에 존재하고 있으며, HCMV의 경우에 5 군데가 존재하는 것으로 알려져 있고 즉시초기 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다. 이외에도 조절부위 II에는 activator protein (AP)-1 결합부위가 존재한다.

초기 유전자의 발현은 즉시초기 유전자에 의해 조절받고 있다. 즉시초기 유전자가 HCMV genome의 비교적 작은 부위에 국한되어 존재하는 것과는 달리 초기 유전자는 광범위하게 분포하고 있으며 그 기능이 아직 확실히 알려져 있지 않은 것들도 많다. 아직 기능이 확실하게 규명되지 않은 초기 유전자 중에는 2.7 kb, 2.2 kb, 그리고 1.2 kb RNA를 암호화하는 유전자들이 있다. MIE 유전자의 promoter/enhancer 부위와 같이 이들 초기 유전자들의 promoter 부위에도 다양한 조절인자가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [11, 12, 21, 25]. 2.7 kb RNA 유전자의 promoter 부위에는 ATF/CREB core sequence, TFIID 결합부위와 upstream stimulatory factor/adenovirus major late transcription factor 결합부위가 존재하고 2.2 kb RNA 유전자의 promoter 부위에는 ATF 결합부위가 존재한다. 1.2 kb RNA 유전자의 promoter 부위에는 AP-1 결합부위

와 TFIID 결합부위가 존재한다.

이상과 같은 다양한 cis-acting 조절부위 중 CRE는 cAMP-dependent protein kinase (PKA)에 의해 활성화되며 NF κ B와 AP1의 활성화는 Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase나 protein kinase C (PKC)에 의해 활성화된다. 이러한 kinase들은 신호전이인자들에 의해 활성화의 조절을 받고 있다. 따라서 MIE 유전자나 초기 유전자 발현에 다양한 신호전이인자들이 관여할 것이라고 추측할 수 있고, 이는 cAMP나 Ca²⁺, PKC activator 등이 HCMV MIEP 활성을 촉진한다는 본 연구결과와 다른 연구실의 여러 보고에 의해 입증되었다 [7, 9, 10]. 신호전이에 있어서의 cGMP의 역할은 불투명하였으나 최근 smooth muscle의 이완이나 macrophage의 분화에 nitric oxide의 기능이 밝혀지고 이는 세포내 cGMP 농도의 상승에 의한 것이라는 것이 밝혀져 cGMP가 신호전이인자로서의 기능을 수행하고 있다는 것이 밝혀졌다 [1, 18]. HCMV에 감염된 세포에서 cAMP [13]나 Ca²⁺ [10, 16]의 농도가 증가하고 이에 의해 HCMV MIE 유전자 발현이 촉진되고, cGMP 농도는 cAMP나 Ca²⁺, 또는 protein kinase에 의해 조절될 수 있다 [14]. 본 연구에서는 신호전이인자로서의 cGMP의 농도가 HCMV에 감염된 세포에서 어떻게 변화하며, 이는 HCMV 유전자 발현에 어떤 영향을 주는지에 대하여 살펴 보았다.

재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

HCMV 증식을 위한 감수성 세포로는 human embryo fibroblast (HEF) 세포를 사용하였다. 세포 성장에는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 10%의 fetal calf serum (FCS)과 0.22%의 sodium bicarbonate (NaHCO₃)를 첨가한 성장배지를 이용하여 75 cm² 세포배양용 플라스크에서 배양하였다. 완전히 자란 세포의 세포단층 (cell monolayer)을 유지하기 위하여 2%의 FCS가 함유된 유지배지를 사용하였다. 세포배양의 적절한 산성도를 유지시켜 주기 위해 5%의 CO₂ 대기농도가 유지되도록 37°C CO₂ 배양기를 이용하였다. 모든 실험에 사용된 바이러스는 HCMV strain AD169이다. HCMV stock을 얻기 위해서 80 cm² 세포배양용 플라스크에서 자란 HEF 세포단층에 0.01~0.05 plaque forming unit (PFU)/cell로 바이러스를 접종하고 15분

간격으로 가볍게 흔들어 주어 37°C에서 1시간 동안 흡착시켰다. 바이러스 감염 4~5일 후 세포변형 효과가 어느 정도 나타나면 배지를 신선한 유지배지로 갈아주고 바이러스 감염 8~10일 후 수확하여 사용하였다.

2. Plasmids

본 연구에 사용된 plasmid로 HCMV MIE 유전자 발현을 알아보기 위한 probe DNA로 사용한 것은 pCMV/*Hind*III로 이는 HCMV genomic DNA를 제한효소인 *Hind*III로 절단하였을 때 얻어지는 E 절편을 포함한다. HCMV 초기 유전자 발현을 알아보기 위해 사용한 plasmid는 2.7 kb, 2.2 kb, 1.2 kb RNA를 암호화하는 유전자의 promoter에 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 유전자가 융합된 p705WOCAT, p358-CAT, p456-CAT으로 Dr. D.H Spector (University of California, San Diego, U.S.A)로부터 얻었다. MIE 유전자가 초기 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 사용한 plasmid DNA는 pEQ336과 pEQ276으로 이들은 pGEM1 vector에 MIE promoter만을 포함하거나, 또는 MIE promoter 및 MIE 구조유전자를 모두 포함하는 plasmid이다. 이들 plasmid DNA의 증폭 및 순수분리는 Sambrook 등 [17]의 방법을 따랐다.

3. 세포내 cGMP 농도 측정

세포배양용 플라스크 (배양면적 75 cm²)에 완전히 자란 HEF 세포에 바이러스를 MOI (multiplicity of infection)가 3 PFU/cell이 되게 감염시키고 0.5, 6, 12, 24, 48, 72, 그리고 96시간이 경과한 후 배지를 제거하고 PBS로 세번 씻어주었다. 세포는 5 ml의 0.1 N HCl을 상온에서 1시간 동안 처리하여 추출하였고, 추출물은 17×100 mm polypropylene tube에 옮겨 진공건조 방법으로 농축시켰다. 건조 농축된 샘플은 소량의 buffer로 재현탁한 후 Gilman [6]의 방법에 근거한 radioimmunoassay에 의해 cGMP 농도를 결정하였다.

4. Transfection

Plasmid DNA의 세포내 도입은 Staprans 등 [21]의 monolayer transfection 방법을 변형하여 수행하였다. Transfection 하기 72시간 전에 세포를 60 mm 페트리디쉬에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 대기에서 배양하였다. Calcium phosphate-DNA 침전물은 다음과 같이 준비하였다. Plasmid DNA 용액 0.22 ml

에 0.25 ml의 2X HEPES-buffered saline (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES, pH 7.05)을 섞은 뒤, 0.031 ml의 1 M CaCl₂를 서서히 첨가하여, 미세한 침전물이 형성될 때까지 실온에 보관하였다. 세포가 배양된 60 mm 페트리디쉬의 배지를 제거한 뒤 calcium phosphate-DNA 현탁액을 세포에 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 한 시간 후에 calcium phosphate-DNA 현탁액을 제거하고 D-PBS로 3회 세척한 뒤 배지를 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 그 후 48 시간 뒤에 세포를 모아서 chloramphenicol acetyltransferase (CAT)의 효소 활성도를 측정하였다.

5. CAT 분석

Plasmid가 transfection된 세포단층을 5 ml의 D-PBS로 세척한 후 트립신 처리를 한 뒤 세포를 모아 미세원심분리 튜브에 옮겼다. 이를 5분간 원심분리한 뒤 0.1 ml의 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5)로 재현탁하였다. 액체질소에 3~4회 얼림과 녹임을 반복하여 세포를 파괴시키고 원심분리하여 상층액을 취하였다. CAT 효소 활성은 FluoReporter FASTCAT Gene Fusion Detection Kit (Molecular Probes; Eugene, OR, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 앞의 방법으로 얻은 세포 추출액 60 µl에 10 µl의 기질과 4 mM acetyl CoA를 첨가하여 잘 혼합한 뒤 37°C에서 12시간 반응시켰다. 여기에 1 ml의 ice-cold ethyl acetate를 첨가하여 반응을 멈춘 뒤 원심분리하여 상층액을 취하였다. 용매를 건조시킨 뒤 각 sample을 10 µl의 ethyl acetate로 재현탁한 것을 silica gel thin-layer chromatography (TLC; Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.) 판에 점적하였다. Chloroform/methanol (9:1)이 함유된 chromatography tank에 TLC 판을 넣고 전개시켰다. 결과를 보존하기 위해 TLC 판을 형광 상태에서 사진을 찍었으며, 정량분석을 위해 각 spot을 긁어서 0.6 ml의 methanol에 녹여 잘 섞어준 다음 5분간 원심분리를 하였다. 여기서 상층액을 취하여 490 nm로 자극시켰을 때, 510 nm에서 발산되는 형광도를 fluorescence spectrophotometer로 측정하였다. CAT 효소의 활성도는 percent (%) conversion으로 표시하였으며 이는 acetylation이 된 chloramphenicol 양과 전체 chloramphenicol 양의 백분율비이다.

6. Total cellular RNA 분리 및 정제

즉시초기 유전자의 발현을 보기 위해서 완전히 자란 세포단층에 HCMV를 MOI가 3이 되게 감염 시키고 감염된지 6시간째에 RNA를 추출하였다. 세포단층으로부터 배지를 제거한 뒤 D-PBS로 2회 세척하고 600 μ l의 solution D (4 M Guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl)를 처리한 뒤 세포를 끊어 미세원심분리 튜브에 옮겼다. 여기에 60 μ l의 2 M sodium acetate (pH 4.0), 600 μ l의 water saturated phenol (pH 4.0), 120 μ l의 chloroform-isoamyl alcohol (49:1)을 처리하고 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액에 750 μ l의 isopropyl alcohol을 가하여 침전시켰다. 이를 원심분리하여 얻은 RNA를 다시 상등액에 300 μ l의 solution D와 600 μ l의 ethanol을 처리하여 -20 $^{\circ}$ C에서 침전시켰다. 다시 원심분리하여 얻은 RNA를 0.1% diethylpyrocarbonate를 처리한 증류수에 용해시켰다.

7. Dot blot assay

1) Probe DNA의 표지

MIE 유전자 탐침으로 사용할 HCMV DNA의 HindIII E 절편이 클론되어 있는 plasmid DNA를 순수분리한 뒤, 제한효소 HindIII로 절단하였다. 이를 0.7% agarose gel로 전기영동 (70 V에서 3시간)한 뒤 21.5 kbp의 HindIII E 절편 부위의 agarose gel을 잘라내어 회수하였다. 이 probe DNA는 PhotoGene Labeling Kit (BRL; Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 사용하여 제시된 nick-translation 방법에 의해 biotin-14-dATP로 표지시켰다.

2) Dot blot에 의한 DNA-RNA hybridization

PhotoGene Nylon Membrane (BRL)을 10X SSC에 15분간 적신 뒤 dot blot 장치에 넣었다. 추출된 RNA는 formamide, formaldehyde (37% solution), 10X MOPS buffer를 첨가한 후 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 뒤 membrane에 부착시켰다. 여기에 denaturing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)을 5분, neutralizing solution (1.5 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl, pH 7.5)을 2분 처리한 후 80 $^{\circ}$ C vaccum dry oven에서 2시간 구웠다. 이 membrane을 plastic hybridization bag에 넣고 prehybridization buffer (50% formamide, 0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM Na₂EDTA, 0.1% ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 1% SDS, 200 μ g/ml freshly

denatured sheared herring sperm DNA)를 첨가한 뒤 42 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 12시간 반응시켰다. Pre-hybridization buffer를 버리고, probe DNA가 들어 있는 hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM Na₂EDTA, 0.1% ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 1% SDS, 200 μ g/ml freshly denatured sheared herring sperm DNA)를 첨가한 뒤 42 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시킨 뒤 세척하였다. 세척된 membrane을 blocking sloution (3% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 65 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시키고 TBS-Tween 20 (0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 1:1,000으로 희석시킨 streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (SA-AP; 1 mg/ml in 3 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 30 mM triethanolamine, pH 7.6)로 실온에서 10분간 결합시켰다. SA-AP가 결합된 membrane을 TBS-Tween 20로 15분간 2회 세척한 뒤 1 X final washing buffer로 60분간 세척하였다. Whatmann No. 3 MM filter 위에 membrane을 올려놓아 건조시킨 뒤 membrane을 PhotoGene Development Folder에 올려 놓았다. Detection reagent를 일정량 처리해주고 23 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C에서 X-ray film에 20분간 노출시켰다.

결 과

1. HCMV 감염에 따른 세포내 cGMP 농도의 변화

HCMV의 감염에 의해서 세포내 cGMP 농도 ([cGMP]i)가 어떻게 변하는지 알아보기 위해 바이러스에 감염된 HEF 세포를 시간대 별로 수확하여 radioimmuno assay에 의해 [cGMP]i를 측정하였다. HCMV에 감염된 세포는 시간에 따라 세포 크기가 변하므로 이를 감안하여 실험결과를 분석하였다. Figure 1에 나타난 것과 같이 [cGMP]i는 바이러스 감염 후 증가하기 시작하여 감염 6시간째에는 10⁶ 세포당 61.3 femtomole로 증가하였고, 12시간째에는 104 femtomole로 최대가 되었다. 이후 HCMV에 감염된 세포에서의 [cGMP]i는 감소하여 감염 24시간 이후에는 40 femtomole 전후의 수치를 보여 mock 감염된 세포에서의 [cGMP]i에 비해 큰 차이를 보이고 있지 않다. 이에 반해 mock 감염된 세포에서의 [cGMP]i는 뚜렷한 농도

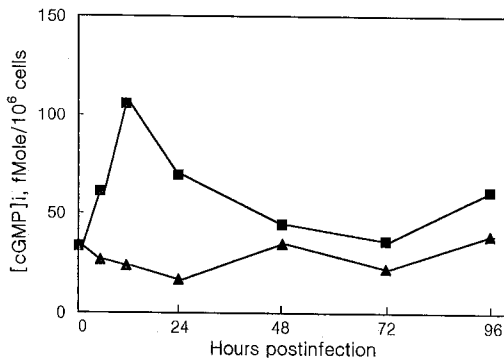


Figure 1. Change of intracellular concentration of cGMP in HCMV-infected HEF cells. Cells were infected with HCMV (MOI = 3 PFU/cell) and samples were collected at the times indicated. The cGMP concentration was determined as described in Materials and Methods. (▲), [cGMP]_i in mock-infected cells; (■), [cGMP]_i in HCMV-infected cells. The data are representative of three independent experiments.

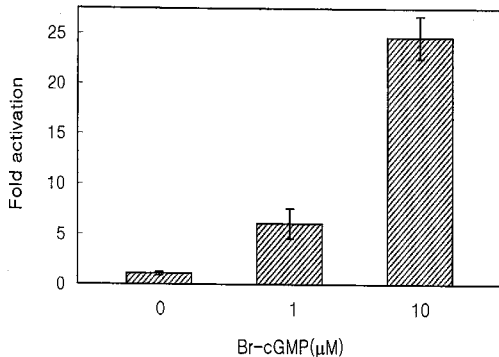


Figure 2. Stimulation of HCMV MIE gene transcription by bromo-cGMP. HEF cells grown in 60 mm petri dishes were infected with HCMV (strain AD169) at MOI of 3 PFU/cell. Media containing the indicated concentrations of bromo-cGMP were added to the dishes at 0 h p. i.. Total cellular RNA was extracted at 6 h p. i. and hybridized with labelled HCMV *Hind*III E fragment. The histograms illustrate the densitometric scanning of autoradiograph. The data are averages of four independent experiments.

의 변화가 관찰되지 않았다.

2. HCMV 유전자 발현에 대한 cGMP의 영향

HCMV에 감염된 HEF 세포에서의 cGMP 농도가 증가하기 시작하는 시기가 감염 후 6시간째로 이때에는 HCMV의 즉시초기 유전자가 활발히 발현되는 시기이다. 따라서 HCMV MIE 유전자 발

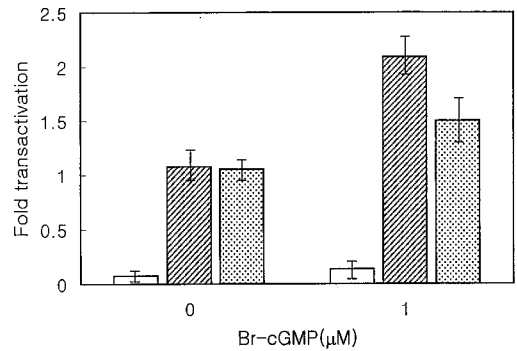


Figure 3. Effect of bromo-cGMP on HCMV early gene expression. Fold transactivation was expressed as MIE1+2 + Early gene/MIE promoter + Early gene ratio. (□), 2.7 kb RNA; (▨), 2.2 kb RNA; (▤), 1.2 kb RNA. The data are averages of four independent experiments.

현이 cGMP에 의해 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위해 cGMP analog로서 세포막을 투과해 세포 안으로 들어갈 수 있는 bromo-cGMP를 사용하였다. 바이러스에 감염된 세포에 bromo-cGMP를 0, 1, 10 μM이 되게 처리하고 감염 후 6시간이 경과하였을 때 RNA를 추출하여 HCMV MIE 유전자를 포함하는 탐침 DNA와의 hybridization을 실시하였다. 실험결과 Figure 2에 나타난 바와 같이 bromo-cGMP는 HCMV MIE transcription을 1 μM에서 7.5배, 10 μM에서 25배 증가시켰다.

HCMV 초기 유전자 발현에 대한 cGMP의 영향을 알아보기 위하여 초기 유전자로서 2.7 kb RNA, 2.2 kb RNA, 그리고 1.2 kb RNA를 암호화하는 유전자의 promoter에 CAT 유전자가 융합된 plasmid인 p705WOCAT, p358-CAT과 p456-CAT을 HEF 세포에 transfection한 뒤 24시간 후에 bromo-cGMP를 처리하고, transfection 48시간 후에 세포를 수확하여 CAT 효소 활성을 측정하였다 (Table 1). 2.2 kb RNA 유전자의 발현은 bromo-cGMP 처리에 의해 농도에 따라 증가한 반면, 1.2 kb RNA 유전자의 발현은 감소하였다. 반면에 2.7 kb RNA 유전자의 발현은 cGMP에 의해 큰 영향을 받지 않았다.

HCMV 초기 유전자 발현은 MIE 유전자에 의해 조절된다. 따라서 MIE 유전자의 초기 유전자 발현에 대한 cGMP의 영향을 알아보기 위하여 초기 유전자의 promoter에 CAT 유전자가 결합된 reporter DNA와 MIE 유전자의 promoter만을 가지는 pEQ336 또는 MIE promoter와 구조유전자를 가지

Table 1. Effect of bromo-cGMP on HCMV E gene expression

E gene	[Bromo-cGMP] (μM)	CAT activity (percent conversion ± standard deviation)
2.7 kb RNA	0	39 ± 5.5
	1	33 ± 4.7
	10	38 ± 4.1
2.2 kb RNA	0	20 ± 2.5
	1	27 ± 3.2
	10	31 ± 3.3
1.2 kb RNA	0	48 ± 3.9
	1	35 ± 5.2
	10	25 ± 2.7

HEF cells in 60 mm dishes were transfected with plasmids containing E gene promoters fused with CAT gene. Transfected cells were treated with the selected concentrations of bromo-cGMP 24 hrs after transfection. CAT assay was done 24 hr after bromo-cGMP treatment using FluoReporter FASTCAT Gene Fusion Detection Kit from Molecular Probes.

는 plasmid인 pEQ276을 함께 세포내로 transfection 하여 도입시키고, 적절한 농도의 bromo-cGMP를 처리하여 CAT 효소 활성도를 측정하였다. 이 결과에서 pEQ276과 함께 있을 때의 초기 유전자 promoter에 의한 CAT 전환 비율을 pEQ336과 함께 있을 때의 초기 유전자 promoter에 의한 CAT 전환 비율로 나눈 값을 구하여 fold-transactivation을 구하였다. 이는 MIE 유전자가 초기 유전자를 활성화시키는 정도를 나타낸다. Figure 3에서 볼 수 있는 바와 같이 2.2 kb RNA 유전자와 1.2 kb RNA 유전자는 MIE 유전자만 존재하였을 때에는 거의 발현 정도에 차이가 없었으나, cGMP가 존재할 때에는 MIE 유전자에 의해서 유전자 발현이 증가하였다. 반면 2.7 kb RNA 유전자의 발현은 MIE 유전자에 의해 억제되었고, 이 억제 효과는 cGMP에 의해 어느 정도 극복되는 것으로 나타났다. 따라서 MIE 유전자에 의한 초기 유전자들의 발현은 cGMP의 존재하에서 촉진된다고 생각된다.

고 찰

세포는 외부의 자극이나 주위 환경의 변화에 대하여 적응하고 반응한다. 환경의 변화나 외부

의 자극은 세포내의 다양한 생리적 변화를 가져 오는데, 이러한 생리적 변화를 매개하는 것이 세포내의 이차전령 물질인 cAMP와 cGMP 같은 cyclic nucleotide와 칼슘, diacylglycerol이다. 이차전령 물질들의 세포내의 농도 변화는 세포내의 protein kinase들의 활성을 조절하고 있으며 활성화된 protein kinase들은 nuclear factor κ B (NF κ B)와 CRE-binding protein (CREB)과 같은 transcription factor나 다른 단백질들을 인산화하여 세포내의 다양한 생리적 변화를 가져오게 한다. 바이러스의 증식을 위해서는 숙주세포가 절대적으로 필요하므로, 숙주세포내의 생리적인 변화를 가져오는 이차전령 물질들과 바이러스의 증식 또는 유전자 발현과의 관계를 이해하는 것은 바이러스의 증식기작의 연구나 바이러스에 의한 질병의 치료에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. HCMV에 의해 감염된 숙주세포에서도 세포내의 이차전령 물질인 cAMP와 칼슘, diacylglycerol의 농도가 증가한다고 알려져 있고 [7,9,10,13], 이들 이차전령 물질들은 서로 밀접한 상호관계를 가지기 때문에 이차전령 물질의 하나인 cGMP와 HCMV 유전자 발현에 대한 상관관계를 조사하여 보았다.

이를 위해 먼저 HCMV에 감염된 세포에서 cGMP의 농도가 어떻게 변하는지를 살펴보았다. 실험결과 cGMP의 세포내 농도 ([cGMP]_i)의 변화는 바이러스 감염 6시간째부터 증가하기 시작하여 12시간째에 최대가 되고, 초기 유전자 발현이 감소하는 24시간째부터는 정상 세포의 수준으로 떨어져 계속 유지되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 HCMV 감염에 따른 [cGMP]_i의 변화 양상은 [cAMP]_i나 세포내 유리칼슘 농도 ([Ca²⁺]_i)의 변화 양상과 뚜렷한 차이가 있다. HCMV에 감염된 세포에서 [cAMP]_i는 감염 직후부터 증가하기 시작하여 감염 6시간째에 최대가 되고 그 후 감소하여 감염 12시간째에는 mock 감염된 세포와 비슷한 수준이 된다 [13]. 한편 [Ca²⁺]_i는 바이러스 감염 후 계속 증가하여 감염 24시간 이후에도 [Ca²⁺]_i 증가가 계속 유지되고 있다 [10]. 이와 같이 HCMV에 감염된 HEF 세포에서의 cAMP, cGMP, Ca²⁺ 같은 신호전이인자들의 농도 변화는 각기 특색있게 변화하고 있다. HCMV 이외의 다른 바이러스 감염에 의한 신호전이인자들의 농도 변화는 herpes simplex virus (HSV), Epstein Barr virus, measles virus, human immunodeficiency virus, rotavirus 등에서 연구되어 왔으나 [cGMP]_i를 측정하는 것은 HSV의 경

우만 알려져 있다 [19]. HSV에 감염된 HEF 세포에서는 [cAMP]_i가 감소하는 반면 [cGMP]_i는 지속적인 증가를 보이고 있다. 따라서 바이러스의 종류에 따라 cyclic nucleotide의 농도 변화의 양상이 다른 것을 알 수 있으며, 이러한 양상의 차이는 바이러스 증식기작의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

HCMV 감염 후 cGMP 농도가 뚜렷하게 증가하는 시기는 감염 24시간 이전으로 이때는 즉시초기 유전자 (최대 발현시기 6시간)와 초기 유전자 (최대 발현시기 12시간)가 발현하는 시기이다. 따라서 cGMP가 HCMV 즉시초기 및 초기 유전자 발현과 밀접한 관련이 있을 것이라고 생각할 수 있다. 이에 따라 cGMP가 HCMV의 즉시초기 유전자의 대표적인 MIE 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 cGMP는 MIE 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다. 그 이유에 대하여는 다음과 같이 생각해 볼 수 있다. 즉, cGMP는 cAMP-dependent phosphodiesterase를 경쟁적으로 저해한다는 보고가 있으므로 [26], cGMP에 의해 cAMP 분해가 억제되고 따라서 발생한 cAMP 농도의 증가가 CREB를 인산화하여 HCMV MIE의 promoter/enhancer 부위의 CRE를 활성화시킨 것으로 생각된다. 이미 보고한 바와 같이 [13] cAMP는 HCMV MIE 유전자 발현을 촉진한다. 따라서 cGMP는 cAMP를 통해 MIE 유전자 발현을 촉진할 수 있다고 생각한다.

세포내 유전자 발현은 적절한 수준으로 조절되고 있으므로 HCMV의 초기 유전자의 발현 역시, 즉시초기 유전자와 세포내의 이차전령 물질 같은 세포내의 인자들에 의하여 조절받고 있을 것으로 생각된다. 이러한 관점에서 초기 유전자의 발현에 미치는 즉시초기 유전자와 cGMP의 영향을 알아보았다. 1.2 kb와 2.2 kb 초기 유전자는 MIE 유전자에 의하여 유전자의 발현이 촉진되고 있으며, 2.7 kb 초기 유전자는 MIE 유전자에 의하여 유전자의 발현이 억제되고 있는 것으로 나타났다. 그러나 실제 바이러스에 감염된 세포에서는 이미 cGMP 농도가 증가한 상태이므로 보다 *in vivo* 상태와 가까운 실험 조건을 잡기 위해 bromo-cGMP를 처리하여 세포내 cGMP 농도를 증가시켜준 상태에서 MIE 유전자가 초기 유전자들의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과 cGMP의 존재하에서는 MIE가 실험에 사용한 세가지 초기 유전자 발현을 모두 촉진하는 것으로 나타났

다. 이러한 현상은 HCMV의 초기 유전자 발현이 적절한 수준으로 조절되고 있으며, HCMV의 초기 유전자 발현의 조절에는 cGMP 같은 cyclic nucleotide들과 즉시초기 유전자가 관여하고 있는 것으로 추측된다. HCMV 초기 유전자의 발현에 미치는 즉시초기 유전자와 이차전령 cyclic nucleotide들의 영향에 대한 연구는 많이 수행되지 않았으므로, 앞으로 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

1. HCMV에 감염된 세포에서는 감염 초기에 cGMP 농도 증가가 관찰되었다.
2. cGMP는 HCMV MIE 유전자 발현을 촉진하였다.
3. 세 종류의 초기 유전자에 대한 MIE 유전자와 cGMP의 영향을 알아본 결과 서로 다른 초기 유전자들은 MIE 유전자와 cGMP에 대해 서로 다른 반응을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 충북대학교 보건의료생명과학 지방대 특성화사업단의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1) Bohme E, Grossmann G, Herz J, Mulsch A, Spies C, Schultz G: Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase: stimulation by NO-containing compounds. *Adv Cyclic Nucl Protein Res* **17**: 259-266, 1984.
- 2) Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W: A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**: 521-530, 1985.
- 3) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison III CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barrell BG: Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**: 125-169, 1990.
- 4) Chang YN, Crawford S, Stall J, Rawlins DR,

- Jeang KT, Hayward GS:** 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, 1990.
- 5) **Ghazal P, Lubon H, Fleckenstein B, Hennighausen L:** Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3658-3662, 1987.
- 6) **Gilman AG:** A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **67**: 305-312, 1970.
- 7) **Hunninghake GW, Monick MM, Liu B, Stinski MF:** The promoter regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains cyclic AMP-response elements. *J Virol* **63**: 3026-3033, 1989.
- 8) **Hutchinson NI, Tocci MJ:** Characterization of a major early gene from the human cytomegalovirus long inverted repeat: predicted amino acid sequence of a 30-kDa protein encoded by the 1.2-kb mRNA. *Virology* **155**: 172-182, 1986.
- 9) **Jee YH, Yoon JH, Lee CH:** Effect of cAMP on the replication of human cytomegalovirus. *Kor J Microbiol* **31**: 72-78, 1993.
- 10) **Kang KH, Yoo CH, Lee CH:** Increased cytosolic free calcium concentration following HCMV infection of human embryo lung cells. *Mol Cells* **3**: 319-325, 1993.
- 11) **Klucher KM, Rabert DK, Spector DH:** Sequences in the human cytomegalovirus 2.7-kilobase RNA promoter which mediate its regulation as an early gene. *J Virol* **63**: 5334-5343, 1989.
- 12) **Klucher KM, Spector DH:** The human cytomegalovirus 2.7-Kilobase RNA promoter contains a functional binding sites for the adenovirus major late transcription factor. *J Virol* **64**: 4189-4198, 1990.
- 13) **Lee CH, Steinsland OS, Albrecht T:** Cytomegalovirus: Increased cyclic AMP levels in permissively infected human fibroblast cells. *Mol Cells* **3**: 47-52, 1993.
- 14) **Lincoln TM, Johnson RM:** Possible role of cyclic-GMP-dependent protein kinases in vascular-smooth muscle function. *Adv Cyclic Nucl Protein Res* **17**: 285-296, 1984.
- 15) **Niller HH, Hennighausen L:** Phytohemagglutinin -induced activity of cyclic AMP (cAMP) response element from cytomegalovirus is reduced by cyclosporine and synergistically enhanced by cAMP. *J Virol* **64**: 2388-2391, 1990.
- 16) **Nokta M, Eaton D, Steinsland OS, Albrecht T:** Ca²⁺ responses in cytomegalovirus-infected fibroblasts of human origin. *Virology* **157**: 259-267, 1987.
- 17) **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- 18) **Snyde SH, Brecht DS:** Biological roles of nitric oxide. *Sci Amer* **May**: 28-35, 1992.
- 19) **Stanwick TL, Anderson RW, Nahmias AJ:** Interaction between cyclic nucleotides and herpes simplex viruses: productive infection. *Infect Immun* **18**: 342-347, 1977.
- 20) **Stamminger T, Fickenscher H, Fleckenstein B:** Cell-type-specific induction of the major immediate early enhancer of human cytomegalovirus by cyclic AMP. *Virology* **71**: 105-113, 1990.
- 21) **Staprans SI, Rabert DK, Spector DH:** Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J Virol* **62**: 3463-3473, 1988.
- 22) **Staprans SI, Spector DH:** 2.2-Kilobase class of early transcripts encoded by human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* **57**: 591-602, 1986.
- 23) **Stinski MF, Roehr TJ:** 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, 1985.
- 24) **Thomsen DR, Stenberg RM, Goins WF, Stinski MF:** Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 659-663, 1984.
- 25) **Wade EJ, Klucher KJ, Spector DH:** An AP-1

bindind site is predominant cis-acting regulatory element in the 1.2-Kilobase early promoter of human cytomegalovirus. *J Virol* **66**: 2407-2417, 1992.

26) **Weiss B**: Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyc Nuc Res* **5**: 195-211, 1975.
