Immune Network No. 1, Vol. 1, 2001

Random peptide library를 이용한 C형 간염바이러스 E2 단백질 세포막 수용체의 peptide mimotope 규명

대구 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실[1], 인제대학교 의과대학 미생물학교실, 내과학교실[2]

이인희[1] · 백재은 · 설상영[2] · 석대현 · 박세광 · 최인학*

Definition of the peptide mimotope of cellular receptor for hepatitis C virus E2 protein using random peptide library

In-Hee Lee[1], Jae-Eun Paik, Sang-Yong Seol[2], Dae-Hyun Seog, Sae-Gwang Park, In-Hak Choi

Department of Internal Medicine[1], School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, Department of Microbiology,

= Abstract =

Background: Hepatitis C virus(HCV), a family of *Flaviviridae*, has a host cell-derived envelope containing a positive-stranded RNA genome, and has been known as the major etiological agent for chronic hepatitis, hepatic cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. There remains a need to dissect a molecular mechanism of pathogenesis for the development of therapeutic and effective preventive measure for HCV. Identification of cellular receptor is of central importance not only to understand the viral pathogenesis, but also to exploit strategies for prevention of HCV. This study was aimed at identifying peptide mimotopes inhibiting the binding of E2 protein of HCV to MOLT-4 cell. **Methods:** In this study, phage peptide library displaying a random peptides consisting of 7 or 12 random peptides was employed in order to pan against E2 protein. Free HCV particles were separated from the immune complex forms by immunoprecipitation using anti-human IgG antibody, and used for HCV-capture ELISA. To identify the peptides inhibiting E2-binding to MOLT-4 cells, E2 protein was subject to bind to MOLT-4 cells under the competition with phage peptides. **Results:** Several phage peptides were selected for their specific binding to E2 protein, which showed the conserved sequence of SHFWRAP from 3 different peptide sequences. They were also able to recognize the HCV particles in the sera of HCV patients captured by monoclonal antibody against E2 protein. Two of them, showing peptide sequence of HLGPWMSHWFQR and WAPPLERSSLFY respectively, were revealed to inhibit the binding of E2 protein to MOLT-4 cell efficiently in dose dependent mode. However, few membrane-associated receptor candidates were seen using Fasta3 programe for homology search with these peptides. **Conclusion:** Phage peptides containing HLGPWMSHWFQR and WAPPLERSSLFY respectively, showed the inhibition of E2-binding to MOLT-4 cells. However, they did not reveal any homologues to cellular receptors from GenBank database. In further study, cellular receptor could be identified through the screening of cDNA library from MOLT-4 or hepatocytes using antibodies against these peptide mimotopes.

Key Words: Hepatitis C virus, E2 protein, Phage peptide library, Peptide mimotope, Cellular receptor

Correspondence : In-Hak Choi, Department of Microbiology, College of Medicine, Inje Univeristy,
633-165 Gaegum-Dong Jin-Gu, Pusan 614-735, Korea
Tel: 051-890-6724, E-mail: miccih@ijnc.inje.ac.kr

서 론

C형 간염바이러스(HCV)는 flaviviridae과에 속하는 9.5 kb의 양성가닥 (positive strand) RNA 바이러스로서 non-A, non-B 간염의 주요 원인체이다[1]. HCV에 이환된 급성 간염환자의 약 70%가 만성 간염으로 이행하며 이들 중 상당한 수에서 간경화와 간세포암이 발생하고 있다. 또한 HCV 감염은 type II, III cryoglobulinemia, B-lymphocyte proliferative disorder와 관련되어 있슴이 알려져 있다[2]. 전세계적으로도 약 1억 7천만명이 HCV에 만성적으로 감염되어 있어서 세계 보건상 주요한 질환이다[3].

비록 HCV의 염기서열이 1989년에 밝혀졌지만[4] *in vitro*에서 HCV를 배양할 수 있는 시스템이 개발되지 않아서 바이러스의 life cycle을 연구하는데 큰 장애가 되고 있다. 지금까지 HCV가 간세포이외에도 B 세포, T 세포, monocyte 등에 감염을 일으킬 수 있다는 보고들이 있지만[1] 바이러스의 tropism에 관여하는 단백질이나 세포막 수용체에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

HCV의 외피 단백질은 31-35 kDa의 E1과 58-74 kDa의 E2가 있다. 이들 중 E2 단백질이 인간 림프종 세포나 간암세포주에 높은 친화도로 결합할 수 있슴이 알려져 있다[5]. 또한 E2에 대한 항체는 표적세포에 대한 E2 단백질의 결합을 방해할 뿐만 아니라 이러한 중화항체가 형성된 침팬지는 동일 혈청형의 HCV에 대해 방어면역을 나타내므로 숙주 세포막 수용체와의 결합에 E2 단백질이 관여할 것으로 추측되고 있다[5]. 그러나 간세포, B와 T 세포 등에서 E2 단백질에 대한 수용체연구는 아직 미흡한 상태이다. 다만 Pileri 등[6]이 E2-결합능을 보이는 인간 T 림프종 세포주인 A2R 세포의 cDNA library를 HCV tropism과 관련이 없는 마우스 세포주에 transfection시켜 E2와 결합하는 클론을 검색한 결과, tetraspanin superfamily에 속하는 CD81 분자가 E2에 대한 T 세포 수용체임을 밝혔다. 그러나 B 세포, monocyte, 간세포 등에 존재하는 HCV 수용체에 대해서는 아직 어떠한 결과도 보고되어 있지 않다. B형 간염바이러스(HBV)의 경우에는 asialoglycoprotein receptor (ASGPR), endonexin II, hepatitis B virus binding factor, transferrin receptor, preS1-BP35 등 여러 개의 수용체를 이용하는 것으로 알려져 있다[7]. 따라서 HCV의 경우에도 숙주세포에 따라서, 혹은 발병기전과 관련된 숙주요소(host factor)에 따라 여러 개의 세포막 수용체가 존재할 가능성이 있다.

최근에는 peptide나 단백질을 filamentous phage 표면에 발현시키는 phage display 기법을 이용하여 수용체의 구조를 규명하는 실험이 시도되고 있다. 경막 수용체는 복잡한 3차원 구조로 되어 있으나 ligand와 결합하는 부위(binding pocket)는 불연속 아미노산 결정기(discontinuous determinants)들로 구성되어 있다. 따라서 특성상 선형구조(linear structure)를 보이는 peptide는 이러한 ligand-결합부위를 모방(mimicking)할 수 있어서 수용체의 구조와 기능을 연구하는데 이용될 수 있다. Goodson 등[8]이 urokinase 세포막 수용체에 대한 peptide mimotope를 밝힌 이후 thrombin 수용체, thrombopoietin 수용체, vascular endothelial growth factor 수용체의 peptide mimotope 등이 보고되었다[9]. 특히 바이러스의 외피단백질에 대한 peptide mimotope 중에서 바이러스의 ligand에 결합하여 세포막 부착과정을 방해하는 것은 구조상 바이러스 ligand와 결합하는 수용체 부위를 모방할 가능성이 많다. 본 연구는 phage peptide library를 이용하여 HCV의 E2 단백질에 결합하는 peptide mimotope을 밝히고 이를 근거로 간세포 수용체 후보들을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

E2 단백질에 대한 peptide library의 biopanning

녹십자로부터 분양받은 E2 융합단백질(gD-E2)을 실험에 사용하였다. gD-E2는 herpes simplex 바이러스의 gD 단백질이 HCV E2 단백질과 융합된 것으로 CHO 세포주에서 발현시켜 anti-gD affinity column에서 분리·정제한 것이다. BSA, gD, gD-E2 단백질의 농도가 각각 5 μg/ml로 조정된 coating buffer (0.1 M NaHCO3, pH 8.6)를 microtiter plate (Maxisorb, Nunc, Denmark)의 각 well에 분주한 후 4℃에서 16시간동안 정치하였다. 각 well을 증류수로 한번 세척한 후 3% BSA/PBS로 blocking하였다. 7- mer 혹은 12-mer의 random peptide가 pIII와 융합되어 발현된 peptide library (Ph.D.7 혹은 Ph.D.12, NEB) 10 μl를 40 μl의 3% BSA/TBS [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] 용액에 첨가하였다. BSA와 gD에 비특이적으로 결합하는 phage peptide를

제거하기 위해 먼저 BSA가 부착된 well에 희석된 library 50 μl를 분주하여 실온에서 1시간 약하게 진탕하였다. 상청액을 회수하여 gD가 부착된 well에 분주하여 위와 같이 반응시켰다. 회수한 상청액을 최종 gD-E2가 부착된 well에 옮긴 후 실온에서 3시간 진탕 반응시켰다. 상청액을 제거하고 0.1% Tween 20이 첨가된 TBS(TBST) buffer로 한 번 세척한 후 50 μl의 elution buffer [0.1 M glycine-HCl (pH 2.2), 0.1% BSA]를 분주하여 gD-E2에 부착된 phage peptide를 용출해 내었다. 용출 즉시 1 M Tris-HCl (pH 9.1)로 phage peptide 용액을 중화시켰다. 각 panning 단계마다 panning에 사용한 phage (input pahge)에 대한 용출된 phage (output phage)의 비 (ratio, O/I ratio)를 계산하였다.

E2-binder의 증폭

OD_{600} nm=0.5까지 배양한 대장균 ER2537 세포 20 ml에 40 μl의 phage peptide 용출액을 접종하여 37℃에 각각 1시간씩 정치 및 진탕 배양한 후 100 ml의 SB 배지 [30 g Bacto-tryptone, 20 g Yeast extract, 10 g MOPS (pH 7.0), per 1 liter]를 첨가하여 37℃에서 16시간 진탕 배양하였다. 배양액을 10,000 X g, 20분, 4℃ 조건으로 원심분리하였다. 상청액에 30 ml의 5X PEG/NaCl [20% PEG (w/v), 15% NaCl (w/v)]을 첨가한 후 4℃에서 30분간 정치시켰다. 원심분리 후 PEG 용액을 완전히 제거하고 1 ml의 3% BSA/TBS 용액으로 phage peptide pellet을 녹인 다음 2차 biopanning에 사용하였다. 2차 panning부터는 gD-E2 단백질의 농도를 각 panning 단계마다 2, 1, 0.5 μg/ml로 서서히 줄이고, 세척과정은 5, 10, 20회로 단계별로 증가시켰다.

E2 단백질에 특이적인 phage peptide의 검색

O/I ratio가 가장 높은 biopanning 단계에서 회수한 phage peptide를 ER2537 세포에 감염시킨 후 plaque가 plate당 100-200개 정도되도록 plating하였다. 멸균된 이쑤시개를 이용하여 plaque를 1 ml의 ER2537 배양액에 접종한 후 37℃에서 5시간동안 진탕 배양하였다. 새로운 SB 배지 900 μl에 배양액 100 μl를 다시 접종하여 37℃에서 16시간동안 진탕 배양하다. 10,000 X g로 원심 분리하여 상청액을 회수한 후 이를 phage peptide 검색에 사용하였다.

먼저 BSA, gD, gD-E2가 각각 1 μg/ml 농도로 부착된 microtiter plate의 각 well을 3% BSA/PBS로 blocking하였다. 각 클론별로 증폭된 phage peptide 용액 50 μl씩을 각 단백질이 부착된 well에 분주하고 실온에서 3시간 진탕 반응시켰다. PBST 용액으로 4번 세척한 다음 HRP-conjugated anti-M13 항체 (Pharmacia, USA)를 1:5,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PBST로 세척한 후 ABTS (Pierce, USA) 용액 100 μl를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 50 μl의 2% SDS를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하여 BSA나 gD에 비해 gD-E2의 흡광도가 가장 높은 클론을 선택하였다.

Peptide sequencing

위에서 언급한 방법으로 증폭한 phage peptide 용액을 원심 분리하여 상청액을 회수하였다. 500 μl의 상청액에 200 μl의 5X PEG/NaCl 용액을 첨가하여 실온에서 10분간 정치시키므로 phage peptide를 침전시켰다. 10,000 X g에서 20분간 원심 분리하여 상청액을 완전히 제거하였다. 10 μl의 iodide buffer (4 M Sodium iodide in TE buffer)를 첨가하여 pellet을 완전히 녹인 후 phage DNA를 침전시키기 위해 250 μl의 에탄올을 분주하고 실온에서 10분간 정치시켰다. 10,000 X g에서 15분간 원심 분리한 후 80% 에탄올로 세척하고 최종 30 μl의 TE buffer로 phage DNA를 녹였다.

DNA 염기서열은 dideoxynucleotide chain termination 방법으로 자동 염기서열 분석기 (ABI, USA)를 이용하여 결정하였다. 이때 sequencing primer는 vector sequence인 5'-GCC CTC ATA GTT AGC GTA ACG-3'을 사용하였다.

혈청내 free form HCV의 분리

일반적으로 C형 간염환자의 혈청내에는 HCV가 free form이나 anti-HCV 항체와 결합하고 있는 면역복합체 (immune complex) 형태로 존재한다[10]. 우선 400 μl의 HCV RNA (+) 혈청을 1:4와 1:43으로 PBS에 희석한 후 10,000 X g에서 5분간 원심 분리하였다. 상청액을 동일 부피의 goat anti-human IgG 항체 용액 (1:1,000)과 각각 혼합한 다음 4℃에서 16시간동안 정치시켰다. 10,000 X g에서 15분간 원심 분리하여 free form HCV가 있는 상청액과 pellet을 각각 회수하였다.

RT-nested PCR로 HCV 확인

상청액과 pellet 부유액에서 HCV 입자의 존재를 확인

하기 위해 RT-nested PCR을 시행하였다. 위에서 회수한 pellet은 멸균된 3차 증류수 200 μl로 부유시켰다. 각각의 회수액에 4배 부피의 RNA zol B solution (TEL-Test. Inc, USA)을 첨가하여 4℃에서 5분간 반응시키고 chloroform : isoamylalcohol (24:1) 200 μl를 혼합하여 4℃, 12,000 rpm에서 14분간 원심분리하였다. 상청액에 isopropanol 500 μl와 tRNA (50 μg/ml) 2 μl를 첨가하여 섞은 후 원심분리하여 HCV RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올로 세척한 다음 pellet을 30 μl의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 포함된 증류수에 녹였다. RNA 용액 17 μl와 HCV의 5'-UTR을 증폭시키는 primer 1과 2를 각각 RT-PCR kit (Bioneer, Korea)에 첨가한 후 57℃에서 10분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들었다. 같은 반응액을 다시 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분 cycle로 35회 반응시키고 마지막에 72℃에서 7분간 더 중합반응을 시행하였다. 일차 PCR 증폭액 2 μl와 nested primer 3과 4를 새로운 PCR kit (Bioneer, Korea)에 첨가하여 위와 같은 조건으로 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 실험에 사용된 primer의 서열은 다음과 같다.

Primer 1 : 5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTT-3',
Primer 2 : 5'-GTCTCGTAGACCGTGCACCATG-3'
Primer 3 : 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'
Primer 4 : 5'-GCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTG-3'

HCV-capture ELISA

혈청내에 존재하는 HCV 입자를 solid phase에 부착시킨 후 이들 바이러스를 phage peptide들이 인지하는지를 알아보기 위해 capture ELISA를 시행하였다. Capturing antibody로 HCV의 E2 단백질에 대한 단세포군 항체인 H25와 토끼 항혈청을 사용하였다. 먼저 이 항체들을 10 μg/ml 농도 되게 coating buffer에 녹인 다음 microtiter plate에 100 μl씩 분주하여 4℃에서 16시간동안 부착시켰다. DW로 한번 세척한 후 0.4% BSA/PBS로 blocking하였다. 위에서 회수한 free form HCV 상청액을 1:64로 희석한 후 각 well에 분주하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 다음, 1×10^{12} pfu의 정제된 phage peptide를 분주하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 이때 대조군으로 E2 단백질과 결합하지 않는 phage peptide를 사용하였다. 이후의 발색과정은 위와 동일하게 시행하였다.

결합중화실험
(Neutralization of binding (NOB) assay)

실험에 사용한 gD-E2는 융합단백질이므로 세포에 대한 결합이 E2에 의해 매개됨을 확인할 필요가 있다. E2 단백질이 부착하는 것으로 알려진 인간 T-림프종 세포주인 MOLT-4 세포를 서울의과대학 세포주 은행으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지로 5% CO_2가 공급되는 37℃ 항온배양기에서 배양하였다. 1 μg의 gD-E2 단백질에 각각 2×10^9, 6×10^9, 1.8×10^{10}, 5.4×10^{10}의 phage peptide를 총 40 μl되게 혼합하여 4℃에서 30분간 반응시켰다. 이 후 5×10^5 MOLT-4 세포가 분주된 각 E-tube에 반응액을 옮겨 세포와 함께 반응시켰다. PBST 용액으로 3번 세척한 다음 세포 pellet을 1X sample buffer [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]로 처리하여 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane에 전사한 후 E2에 특이적인 H52 단세포군 항체와 HRP-conjugated anti-mouse IgG 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다. 발색반응은 ECL 기질용액 (Amersham, USA)으로 하였으며, X-Omat film (Kodak, USA)에 감광하여 현상하였다.

결 과

E2에 대한 biopanning

7 mer-, 12 mer peptide library를 gD-E2 단백질에 대해 6차에 걸쳐 biopanning을 실시하고 각 panning 단계에서 회수한 phage peptide들의 output phage/input phage 비(ratio)를 결정하였다. 7-mer library는 전반적으로 5차 panning까지 뚜렷한 증가는 없었다. 그러나 12-mer library의 경우, panning 횟수가 거듭될수록 O/I ratio가 증가하여 최종단계에서는 가장 높은 ratio를 보였다 (그림 1A).

E2-binder의 검색

각 library의 panning 단계중 O/I ratio가 가장 높은 3차(7-mer library)와 5차(12-mer library) 단계에서 회수한 phage peptide를 plaque 형태로 확보하였다. 각 plaque로

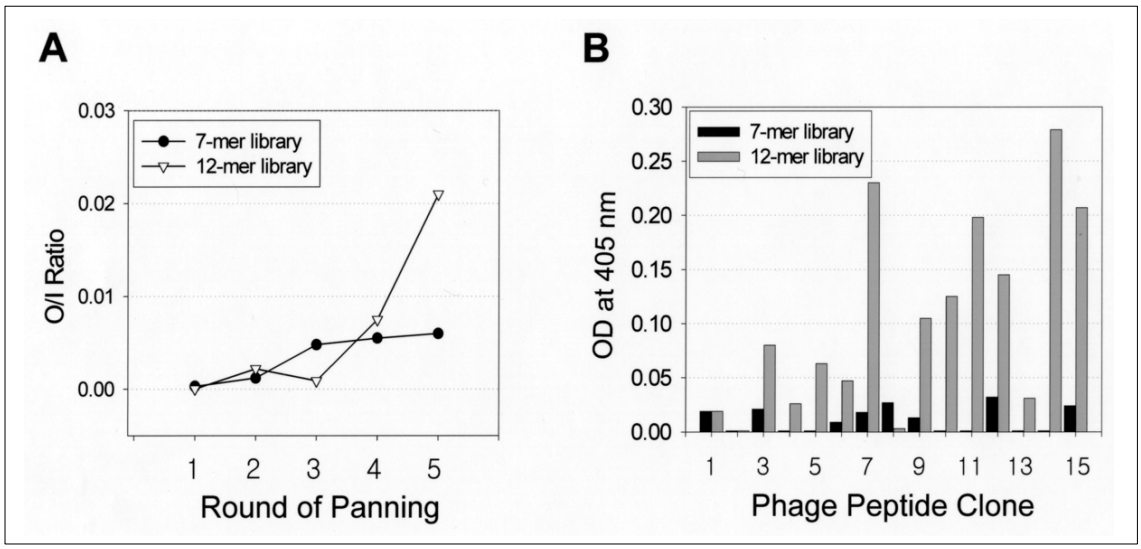

Fig. 1. Biopanning of phage peptide. (A) Output phage / Input phage (O/I) ratio. From each biopanning step, E2-binding phage peptides were eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.2), amplified and concentrated for subsequent panning. Enrichment of specific phages from either 7-mer or 12-mer is described as a ratio of eluted phages (output phage) over phages applied into reaction (input phage). (B) ELISA of phage peptides selected from either 7-mer or 12-mer phage peptide library. Phage peptides from each plaques were infected and amplified into *E.coli* ER2537. ELISA against E2 protein was performed using phages concentrated with PEG. Bound phages were detected using HRP-conjugated anti-M13 antibody and OPD as a color reagent.

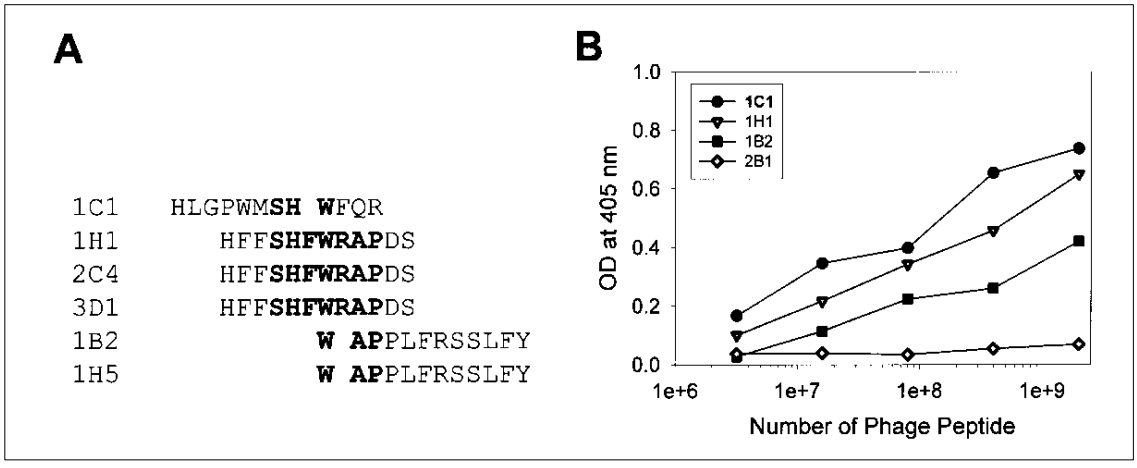

Fig. 2. Specificity of phage peptides. (A) Phage peptide sequences are determined. Conserved sequences are indicated as bold letters. (B) Phage peptides of indicated number were added and incubated into E2-coated wells of microtiter plate. Bound phages were detected using HRP-conjugated anti-M13 antibody and OPD as a color reagent.

부터 phage을 증폭시킨 후 BSA, gD, gD-E2에 대해 ELISA를 시행하였다. 7-mer library에서 유래한 phage들의 E2에 대한 반응성은 대체로 0.025 정도로 낮았으나 12-mer library의 phage들은 평균 흡광도가 0.15 정도로 7-mer library보다도 6배 가량 높은 반응성을 보여 (그림 1B), 본 실험에서는 12-mer library에서 유래한 phage를 사용하기로 하였다. 증폭된 각 phage peptide들중에서 BSA와 gD에 비해 gD-E2에 대한 반응성이 높은 6개의 phage 클론을 선택하였다. 이들의 E2에 대한 반응성은 0.15-0.27 정도이었다.

Peptide sequence의 결정

E2에 대해 높은 결합력을 보이는 6개의 phage peptide 클론의 DNA를 정제하여 염기서열을 분석한 결과 Ser-His-Phe-Try-Arg-Ala-Pro (SHFWRAP)의 7개 아미노산이 conserved 되어 있었다 (그림 2A). 이들 각 클론들의 E2에 대한 결합특이도 (binding specificity)를 조사하기 위하여 phage peptide를 dose별로 E2에 반응시켰다. 1C1, 1H1, 1B2 등은 phage의 dose에 비례하여 반응성이 증가하였으나 대조군인 2B1 phage는 dose에 관계없이 E2와 반응하지 않았다 (그림 2B).

HCV-capture ELISA

먼저 HCV RNA titer가 10^6 이상인 C형 간염환자의

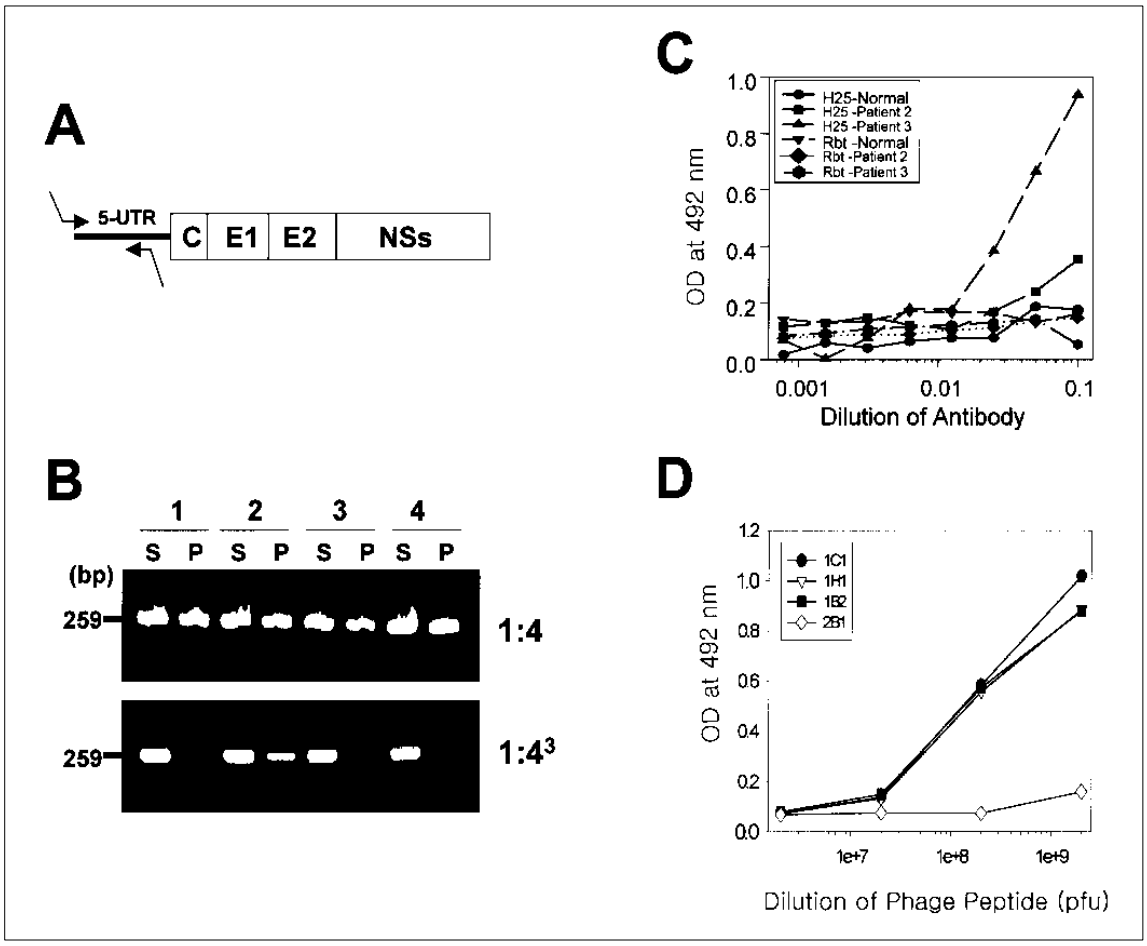

Fig. 3. Detection of HCV particles using phage peptides. (A) Diagram of strategy for amplification of 5'UTR of HCV RNA genome using nested primers. (B) The sera from patients with hepatitis C diluted to 1:4 or $1:4^3$ were incubated with anti-human IgG antibody, centrifuged to restore pellets and supernatant fractions. Each fraction was treated with RNA zol B solution for purification of RNA, and subjected to RT-nested PCR for amplification of RNA genome (P: pellet, S: supernatant). (C) The sera of patients with hepatitis C were incubated in wells of microtiter plate coated with anti-E2 rabbit sera (Rbt) and anti-E2 monoclonal antibody (H25), respectively. The captured viral particles with antibodies as indicated above were detected with anti-E2 monoclonal antibody and HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody, or anti-E2 rabbit antibody and HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody, respectively. (D) Phage peptides of indicated numbers from each clone were added into the wells coated with H25 monoclonal antibody of microtiter plate where the patient's serum were preincubated. After washing with PBST, bound phage peptides were detected using HRP-conjugated anti-M13 antibody and OPD as a color reagent.

혈청에 대해 면역침강(immunoprecipitation)과 RT-nested PCR을 실시하여 혈청내에 존재하는 free form의 HCV를 확인하였다. High titer를 보인 4명의 혈청을 1:4로 희석한 검체에서는 면역침강 후 pellet에서 모두 immune complex form이 관찰되었으나 1:64로 희석한 검체중 3개에서 HCV RNA는 pellet이 아닌 상청액에서만 확인되었다. 따라서 이들 혈청을 1:64로 희석하여 실험에 사용하였다 (그림 3A,B).

in vitro 실험에서 혈청내에 존재하는 HCV 입자가 capture antibody에 의해 solid phase인 ELISA plate에 부착될 수 있는지 알아보기 위해 HCV 단세포군 항체인 H25 항체와 토끼 항혈청을 이용하여 capture ELISA를 시행하였다. 토끼 항혈청보다 마우스 단세포군 항체가 HCV 입자의 포획(capturing)에 더 효과적이었으며, free form의 HCV가 있는 검체에서만 포획이 일어났다 (그림 3C). 이러한 포획조건을 기초로하여 H25 단세포군 항체에 포획된 HCV 입자를 phage peptide가 인지할 수 있는지를 capture ELISA로 확인하였다. E2 결합이 확인된 1C1, 1H1, 1B2 클론의 phage들은 phage dose에 비례하여 포획된 바이러스 입자와 결합하였으나 대조군 phage는 dose에 관계없이 HCV 입자를 인지하지 못하였다(그림 3D).

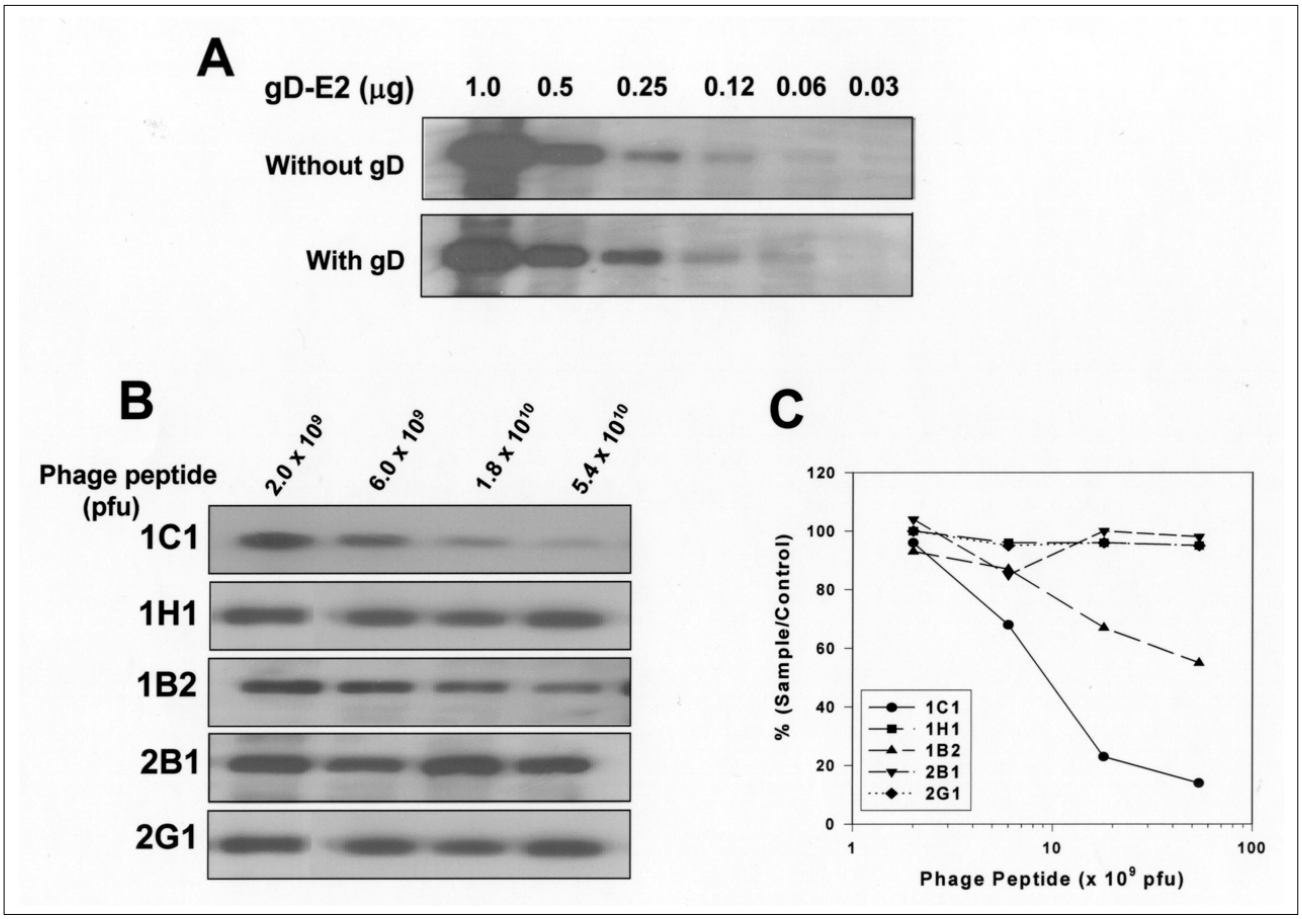

Fig. 4. Neutralization of binding of E2 protein to MOLT-4 cells. (A) gD-E2 of indicated amount was allowed to react with 0.5 μg gD, then mixture was added into MOLT-4 cells. After washing with PBST, the cells were treated with sample buffer and subjected to SDS-PAGE and Western blot. E2 protein bound to MOLT-4 cells was detected using anti-E2 monoclonal antibody as a primary antibody and HRP-conjugated anti-mouse IgG as a secondary antibody and ECL as a color reagent. (B) E2 protein was mixed with phage peptides of indicated numbers from each clone, and incubated with 5 X 10^5 MOLT-4 cells. After washing in PBST, the cells were treated with sample buffer and subjected to SDS-PAGE and Western blot. E2 protein bound to MOLT-4 cells was detected as described elsewhere. (C) Graph describing a densitometric analysis based on the (A), in which the signal of each phage peptide was compared with that of control phage peptide and the results were indicated as percentage.

결합중화실험

E2의 MOLT-4 세포 부착(결합)을 억제하는 phage peptide를 확인하기 위해 결합중화실험을 실시하였다. 우선 융합단백질인 gD-E2의 MOLT-4 세포부착이 E2에 의한 특이적인 결합임을 증명하기 위해 gD-E2의 세포부착을 gD 단백질로 competition시켰다. 그림 4A에서의 결과처럼 gD-E2는 gD 단백질에 관계없이 MOLT-4 세포에 부착하였다. 따라서 gD-E2의 세포부착은 E2에 의해 매개되는 과정임을 알 수 있었다.

Phage peptide들을 dose 별로 gD-E2와 반응시킨 다음 MOLT-4 세포에 부착시켜 결합과정이 억제되는 정도를 살펴보았다. 1C1과 1B2 클론이 phage dose에 비례하여 MOLT-4에 대한 E2 부착을 억제하였으며 그 중에서도 1C1의 억제정도가 더 강하게 나타났다. 그러나 1H1와 대조군인 2B1과 2G1은 결합억제를 보이지 않았다 (그림 4B,C).

고 찰

바이러스 감염의 초기단계를 규정짓는 숙주세포와의 부착/결합과정은 외피소유 바이러스(enveloped virus)들 중에서도 과(family)에 따라 다른 양상을 보인다. Rhabdoviridae과에 속하는 rabies virus는 외피단백질인 trimeric G protein이 뉴런(neuron) 표면에 있는 neural cell adhesion molecule (NCAM)에 부착되면 신경세포 안으로 endocytosis된다. Endosome내에서 낮은 pH로 인해 바이러스의 외피단백질의 구조가 변형되면서 바이러스 외피와 endosomal membrane 사이에 융합이 일어나 세포질 내로 바이러스가 유리된다. 이와 유사한 침투과정은 influenza virus에서도 관찰된다[11]. 또한 일부의 바이러스들은 이와는 달리 두 단계의 부착과정을 거치면서 숙주세포막과 직접 융합되면서 핵산을 세포질 내로 유리하기도 한다. Herpes simplex virus type 1의 gB, gC 단백질과 human cytomegalovirus의 gB 단백질 등은 친화도가 낮은 heparan sulfate proteoglycan(HSPG) 수용체에 먼저 부착한 다음, gD 단백질 등 다른 종류의 외피단백질을 이용하여 높은 친화도로 integrin에 결합하면서 숙주세포의 plasma membrane과 융합하게 된다[12]. Lentivirus에 속하는 human immunodeficiency virus type 1의 경우에는 gp120 단백질이 helper T 세포의 CD4 분자와 chemokine 수용체인 CCR-5와 연속적으로 결합하면 바이러스 표면의 spike protein인 gp41 단백질이 직접 세포막과 융합을 일으키게 된다[13]. 즉, 바이러스 외피단백질과 결합하는 세포수용체에 따라 바이러스의 부착/침투 과정이 다를 수 있으므로, 바이러스의 침투기전을 이해하기 위해서는 수용체의 규명이 선결되어야 할 것이다.

외피소유 바이러스인 HCV의 세포막 수용체에 대한 연구는 바이러스 정제상의 어려움, 적절한 배양 시스템의 부재, 실험 동물모델의 제약 등으로 인해 체계적인 연구가 미흡한 실정이다. 다만 HCV의 외피 단백질인 E1과 E2에 대한 재조합 단백질의 발현, 면역원성 연구, 유전적 변이에 따른 구조연구 등을 통해 E2 단백질이 간세포 수용체에 대한 바이러스 ligand로 작용할 수 있음이 간접적으로 증명되고 있다[5].

본 실험에서는 HCV의 E2 단백질에 대한 세포 수용체를 규명하려는 연구의 일환으로 먼저 E2의 세포막 부착을 방해하는 peptide mimotope을 phage peptide library를 이용하여 밝히고 이 mimotope을 근거로 예상되는 수용체들을 확인하고자 하였다. 이러한 실험적 접근방식을 선택한 이유는 다음의 사실들에 근거하였기 때문이다. 첫째, random peptide 서열들이 filamentous phage 표면에 발현된 phage peptide library는 생물학적으로 활성이 있는 peptide ligand를 제공할 수 있으며, high-throughput assay를 통해 높은 친화도의 peptide를 선택할 수 있기 때문에 단백질-단백질 상호작용 연구에 적합하다. 둘째, 바이러스의 세포막 부착을 방해하여 바이러스 감염을 중화할 수 있는 peptide를 선택한 다음, 결합에 중요한 active motif를 근거로 유사한 서열을 검색하면 세포막과 연관된 수용체 후보를 확인할 수 있다. 실제로 이와 같은 방법을 이용하여 puumala hantavirus와 echovirus 22에 대한 세포막 수용체가 각각 integrin과 gamma carboxylase임을 밝힌 결과들이 보고되었다[14].

먼저 7개와 12개의 아미노산이 무작위로 표면에 발현된 7-/12-mer phage peptide library로 E2 단백질에 대해 panning을 실시하여 특이적 결합반응을 보이는 클론들을 선택하였다. 7-mer phage peptide library는 12-mer library보다 전반적으로 결합반응이 약하였다. 이는 7개 아미노산의 결합력이 상대적으로 낮아서 발생할 수 있는 현상으로 이해되며, 최종 5차 panning 후 output phage와 input phage의 비(ratio)를 비교해 볼 때 7-mer library가 12-mer library보다 약 4배정도 낮게 나온 결과도 이를 뒷받침해 주는 것으로 생각된다. 따라서 본 실

험에서는 12-mer library를 이용하였다.

E2 단백질에 결합하는 phage peptide들을 선택하여 아미노산 서열을 분석한 결과 3개의 서로 다른 peptide mimotope이 확인되었으며, 이들은 Ser-His-Phe-Try-Arg-Ala-Pro (SHFWRAP)의 공통된 아미노산 서열을 가지고 있었다. 3종류의 phage peptide들은 모두 E2 단백질에 대해 특이적으로 결합하였으며, C형 간염환자의 혈청에 존재하는 HCV 바이러스 입자도 인지할 수 있었다. 다만 이들이 특이적으로 바이러스 입자와 결합하였는지는 앞으로 E2 단백질을 이용한 inhibition test을 통해 밝혀야 할 것이다. 이들 중에서 1C1과 1B2 두 개의 클론이 MOLT-4 세포에 대한 E2 단백질의 결합을 방해하였으며, 나머지 1H1은 E2의 결합반응에 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 1C1과 1B2가 E2 단백질의 binding motif중에서 T 세포와의 결합에 관여하는 부위에 결합하고 이들은 T 세포의 수용체를 모방할 가능성이 높다고 생각되었으나 본 실험에서 확보한 peptide mimotope의 아미노산 서열과 유사한 유전자를 검색하기 위해 Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)에서 제공하는 Fasta3 프로그램을 이용하여 비교한 결과 의미있는 세포막 수용체 후보는 없었다. 수용체의 결합부위는 α-helix나 β-sheet 등 선형구조(linear structure)로 되어 있거나 혹은 3차 구조로 된 conformational motif로 구성되어 있어서 peptide mimotope는 이들 구조를 모방할 수 있다. 선형구조를 모방할 경우, 유사도 확인실험으로 mimotope에 근접한 유전자를 예상할 수 있으나 3차 구조를 모방할 경우에는 그러한 예측이 불가능하다. 따라서 두 peptide mimotope는 모두 수용체의 conformational motif를 모방할 가능성 높다고 생각된다.

앞으로의 실험에서 peptide mimotope를 bovine serum albumin(BSA)나 keyhole limpet hemocyanin(KLH)등 carrier protein에 화학적으로 결합시킨 후 마우스나 토끼 등에 면역하여 항-peptide mimotope 항체를 개발하여 수용체 발현세포의 cDNA library를 검색하면 새로운 수용체의 규명도 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hollinger FB, Robinson WS : Hepatitis viruses and their replication, Houghton M, Fields BN, Knipe DM, Howely PM eds : Virology, p1035-1058, Lippincott-Raven, 1996
2. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM : A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. New Engl. J Med 327 ; 1490, 1992
3. World Health Organiztion Weekly Epidemiology. Report. 72 ; 651, 1997
4. Choo QL, Kuo E, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M : Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244 ; 359-362, 1989
5. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S : A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. Proc Natl Acad Sci USA 93(5) ; 1759-1763, 1996
6. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petraeca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S : Binding of hepatitis C virus to CD81. Science 282 ; 938-941, 1998
7. Mabit H, Vons C, Dubanchet S, Capel F, Franco D and Petit MA : Primary cultured normal human hepatocytes fro hepatitis B virus receptor studies. J Hepatology 24 ; 403-412, 1996
8. Goodson RJ, Doyle MV, Kaufman SE, Rosenberg S. : High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. Proc Natl Acad Sci USA 91(15) ; 7129-7133, 1994
9. Cwirla SE, Balasubramanian P, Duffin DJ, Wagstrom CR, Gates CM, Singer SC, Davis AM, Tansik RL, Mattheakis LC, Boytos CM, Schatz PJ, Baccanari DP, Wrighton NC, Barrett RW, Dower WJ : Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. Science 276 ; 1696-1699, 1997
10. Troisi CL, Hollinger FB : Detection of antibodies to hepatitis C virus in seronegative patients using an immune complex dissociation assay. J Viral Hepat 4(6) ; 383-386, 1997
11. Thoulouze MI, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M : The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. J Virol 72 ; 7181-7190, 1998
12. Compton T : Towards a definition of the HCMV entry pathway. Scand J Infect Dis 99 ; 30-32, 1995

13. Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, Pasternack MS, Luster AD : Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. Nature 391 ; 908-911, 1998
14. Heiskanen T, Lundkvist A, Vaheri A, Lankinen H : Phage-displayed peptide targeting on the puumala hantavirus neutralization site. J Virol 71 ; 3879-3885, 1997

미 주

이 논문은 1999년 한국 학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음. (KRF99-041-F00093)