

인간 포미바이러스 인테그라제의 생화학적 특성

강승이 · 오수아 · 이학성 · 한성태 · 서진욱 · 신차균[#]

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

(Received January 2, 2004; Revised February 9, 2004)

Biochemical Characterization of Human Foamy Virus Integrase

Seung Yi Kang, Soo A Oh, Hak Sung Lee, Sung Tai Han, Jin-Wook Seo and Cha-Gyun Shin[#]

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

Abstract — A bacterial expression vector for the human foamy virus (HFV) integrase was constructed and expressed in *Escherichia coli*. By two-step purification using a nickel-chelated column and a SP-sepharose chromatography, the HFV integrase protein of 43 kDa was purified to near homogeneity, and used to investigate biochemical characteristics of the enzymatic activities, such as endonucleolytic and disintegration activities. Oligonucleotide substrates were specifically and efficiently cleaved by the purified HFV integrase in the presence of Mn^{+2} , but not in the presence of Mg^{+2} , indicating that the HFV integrase is not able to use Mg^{+2} as a cofactor. Endonucleolytic reaction was almost completed in 60 min at 37 °C. In addition, the maximum enzymatic activities were observed at 5 mM Mn^{+2} in the buffer of which pH was from 7.0 to 9.0. The endonucleolytic activities were dose-dependently blocked in the addition of baicalein or chicolic acid which is a well-known inhibitor of human immunodeficiency virus integrase.

Keywords □ HFV, integrase, endonucleolytic, disintegration

포미바이러스는 리트로바이러스의 일원으로 인간을 포함하는 많은 동물에서 발견되고 있다.¹⁻⁴⁾ 인간세포를 감염하는 인간포미 바이러스는 인후암 환자에서 처음 발견된 후, 감염환자에게서도 발견되고 있어 인간에게 질병을 유발할 수 있는 가능성을 보여 주고 있다.^{5,6)} 인간포미바이러스는 약 12 kb의 동일한 2개의 RNA 를 바이러스 유전자로 보유하여, 리트로바이러스로서는 가장 큰 genome을 함유한다. 바이러스가 인간세포의 원형질에 침투한 후, RNA 유전자는 역전사효소에 의하여 이중나선의 DNA로 전환되고, 바이러스 DNA는 세포 핵 안으로 이동한 후, 세포의 유전자 안으로 중합된다. 바이러스 유전자가 복제되고, 자손바이러스를 생산하기 위해서는 바이러스 유전자의 세포 유전자로의 중합이 필수불가결하며, 이러한 과정은 바이러스 특유의 효소, integrase 에 의하여 이루어진다.^{7,8)}

리트로바이러스의 integrase는 세포 안에서 바이러스 유전자를 세포의 유전자에 중합시키는 과정에서 일렬의 DNA 절단과 접합의 반응을 진행한다. 먼저, 직선형의 바이러스 DNA의 3'-말

단에서 2개의 핵산을 제거한다.⁹⁾ 이과정은 바이러스 중에 따른 특이 반응으로, 자신의 바이러스 DNA에 선택적으로 작용한다. 또한 integrase는 숙주세포의 DNA를 계단식으로 절단한다. 숙주세포의 유전자가 절단되는 곳의 염기서열은 비특이적이다. 다음과정에서 integrase는 2개의 핵산이 절단된 바이러스 DNA의 3'-말단을 이미 잘라 놓은 숙주세포의 DNA의 5'-말단에 공유결합적으로 연결시킨다. 연결되지 않은 바이러스 DNA의 5'-말단은 세포의 유전자 복구효소들에 의하여 염기쌍을 이루지 못한 2개의 핵산이 제거된 후, 유전자 복구 과정에 의하여 이미 잘려진 세포 유전자의 3'-말단에 연결되어 바이러스 유전자의 중합과정이 완성된다.¹⁰⁾

리트로바이러스의 integrase는 *in vitro*에서 3가지의 생물학적 활성이 있다. 이러한 활성은 바이러스 DNA의 끝부분의 염기서열을 갖는 올리고핵산을 이용하여 측정할 수 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 첫째, endonucleolytic 활성으로 바이러스 DNA 끝의 염기서열을 갖는 짧은 duplex oligonucleotide를 기질로 사용하여 DNA의 3'-말단의 2개의 핵산을 제거한다. 둘째, strand transfer 활성으로 integrase는 3'-말단의 2개의 핵산이 절단된 duplex oligonucleotide를 target DNA에 집어넣는다. 셋째, integrase는 disintegration 활성을 나타낸다. Duplex oligonucleotide의 기질이 중합된 형태

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

와 같은 Y-형태의 합성된 duplex oligonucleotide에 integrase를 첨가하면 선택적으로 branch부분을 끊어낸다. 이러한 활성들은 방사능으로 표식된 올리고핵산을 이용하여 선택적으로 측정할 수 있다.¹⁴⁾

인간포미바이러스의 integrase는 면역결핍바이러스, Rous sarcoma 바이러스 등의 integrase가 많이 연구된 것에 비하여, 거의 연구되어 있지 않다. Pahl과 Flugel이 박테리아에서 발현한 인간포미바이러스 integrase가 효소활성이 있음을 최초로 보고한 이후, 더 진전된 연구가 보고되지 않고 있다.^{15,16)} 또한 Pahl과 Flugel이 정제하여 사용한 효소도 NTA 컬럼과 Mono S 컬럼을 이용한 정제로써, 정제의 순도가 낮아, 비특이적인 nuclease의 활성을 많이 함유하여 효소에 대한 생화학적 특성을 규명하지 못하고 있다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 인간포미바이러스 integrase의 생화학적 특성을 연구하기 위하여, integrase의 유전자를 발현벡터에 클로닝하고, 대장균에서 발현하여 NTA 컬럼과 SP-sepharose 컬럼으로 정제하여, 비특이적인 nuclease의 활성이 거의 제거된 효소를 이용하여, integrase 효소활성의 발현 특성을 조사하였다.

실험방법

시약 및 재료

발현벡터 제작 및 기질로 사용된 oligonucleotide들은 Takara (Korea)에서 제작하였다. Pfu polymerase는 Promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 제한효소 및 T4 DNA polynucleotide, T4 DNA ligase는 New England Biolabs(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. [γ -³²P]ATP는 Amersham에서 얻었다. Integrase 단백질 정제와 관련된 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

발현벡터 제작

포미바이러스 integrase의 발현벡터는 PCR방법으로 제작하였다. 유전자 증폭을 위하여 5'말단 쪽에 FN(5'-CAGGGTCCATATGAAAGGATATCCCAAACAATATAC-3')과 3'말단 쪽에 FC(5'-GTATAATTGGATCCTTCTGCTGTTTCAGTCACAG-3')를 각기 primer로 사용하고, 포미바이러스 cDNA(pHSRV)를 template로 사용하였다.¹⁷⁾ 증폭된 유전자의 돌연변이를 최소화하기 위하여, pfu polymerase를 이용하여 유전자 증폭기(My Genie 96, Bioneer)로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 NdeI과 BamHI으로 처리하고, 미리 준비된 pET15b 발현벡터에 도입하여 제작하였다. 제작된 발현벡터(pETHFIN)의 정확한 염기서열은 DNA sequencing으로 확인하였다.

단백질의 정제

Integrase 단백질의 정제는 pETHFIN을 함유하는 대장균

[BL21(DE3)] 균주를 이용하였다. 발현벡터를 함유하는 균주를 100 μ g/ml의 ampicillin을 포함하는 Luria-Bertani 배지에서 배양을 하여 흡광도가 600 nm에서 0.7이 될 때, isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)을 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하고 3시간 동안 더 배양하였다. 원심분리하여 균체를 모으고, 완충용액 S1[50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 20 mM β -MeOH, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSE, 10 mM imidazole]에 현탁한 후 lysozyme을 1 mg/ml되게 첨가한다. 얼음에서 30분간 방치한 후, 고농도의 NaCl과 CHAPS를 각각 첨가하여 최종농도가 1 M과 10 mM이 되게 하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기(XL2020, Misonix, USA)을 이용해서 균체를 파괴하고, 파괴된 균체의 용액을 4°C에서 40,000 \times g로 20분간 원심분리하여 integrase 단백질을 함유하는 상등액을 따로 분리하였다. 상등액을 미리 준비한 Ni-NTA column(Qiagen, USA)을 통과시키고, 완충용액 S10[50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 20 mM β -MeOH, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSE, 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 컬럼을 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 integrase는 600 mM NaCl 근처에서 추출되었다. 정제된 integrase는 SDS-PAGE와 Bradford assay로 분석하였다.

기질 제작 및 효소활성 측정

Endonucleolytic 반응 기질은 바이러스 DNA의 끝의 염기서열과 동일한 20 base-pair의 이중가닥 올리고핵산을 방사능으로 표식하여 기질로 사용하였다.^{15,18)} 100 pmol의 올리고핵산 FV2(U5-LTR, +strand; 5'-ATACAAAATTCATGACAAT-3')를 50 μ Ci의 γ -³²P-ATP(3000 Ci/mmol, 1 Ci=37 GBq, Amersham)를 함유하는 40 μ l의 반응용액[70 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT]에서 10 unit의 T4 PNK로 37°C에서 15분간 처리하고, 0.5 M EDTA와 5 M NaCl 1 μ l을 첨가하고, 120 pmol의 올리고핵산 FV1(U5-LTR, +strand; 5'-ATTGTCATGG-AATTTTGTAT-3')을 넣은 후, 3분간 100°C에서 가열하고 천천히 식히고, 반응액을 Biospin-6를 통과시켜, 반응하지 않은 γ -³²P-ATP를 제거하였다.¹⁸⁾

Disintegration 활성의 측정에 사용되는 기질로써는 Y-모양의 올리고핵산은 다음과 같이 제작하였다. 15mer인 올리고핵산

FT1(5'-GAGCAACGCAAGCTT-3')을 위에서와 같은 방법으로 방사능을 표식하고, 33mer인 FT2(5'-GTAGTCGACCTGCA-GCCCAAGCTTGC GTTGTCTC-3')와 36mer인 FV3(5'-ATACA-AAATTCCATGACAGGGCTGCAGGTCGACTAC-3'), 20mer인 FV1을 넣어서 상보적인 결합이 일어나게 하여 제작하였다.

Endonucleolytic 활성은 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 300 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 진행 정도는 건조한 전기영동 젤을 phosphoimage analyzer(GS-525, Bio-Rad)에서 정량하였다. Disintegration 반응은 사용한 기질이 방사능이 표식된 Y-모양의 기질인 것을 제외하고, 나머지의 반응 조건은 endonucleolytic 반응의 조건과 동일하였다. Disintegration 활성은 방사능으로 표식된 올리고핵산 15mer가 33mer로 전환되는 것을 조사하였다.¹⁸⁾

결과 및 고찰

발현벡터의 제작 및 포미바이러스 integrase 정제

비특이적인 nuclease 활성이 제거된 인간포미바이러스 integrase를 박테리아에서 충분한 양을 얻기 위하여, 약 1.2 kb의 integrase 유전자를 pET15b 발현벡터에 클로닝하였다.¹⁷⁾ 아직 정확하게 인간포미바이러스 integrase 유전자의 시작과 끝이 알려져 있지 않

으므로, PstI과 Fluegel이 클로닝한 부위의 유전자를 목표로,¹⁵⁾ 각기 NdeI 제한효소 절단부위와 BamHI 제한효소 절단부위를 갖는 2개의 올리고핵산 프라머를 사용하여 유전자증폭기로 증폭된 1.2 kb의 단편을 발현벡터에 도입하였다(Fig. 1A). Integrase 유전자를 증폭할 때에는 pfu polymerase를 사용하여 증폭과정에서의 돌연변이의 발생을 최소화하였으며, DNA sequencing을 통하여 도입부위에서 integrase 유전자가 정확한 염기서열로 도입되었음을 확인하였다. Integrase 단백질의 정제는 발현벡터에서 클로닝한 재조합 단백질의 N-말단에 붙게한 histidine tag를 이용하여 Ni²⁺-킬레이트 컬럼과 SP-sepharose 컬럼으로 수행하였다(Fig. 1B). Histidine tag를 이용한 재조합 단백질의 정제는 6~10개의 histidine이 반복된 단백질 부분이 Ni²⁺-킬레이트 지지체에 선택적으로 결합하는 성질을 이용한 것으로, 단백질에 따라서는 이방법을 이용한 단 한번의 정제로도 고순도의 단백질을 정제할 수 있는 까닭에, 면역결핍바이러스의 integrase를 포함하는, 여러 재조합 단백질들의 정제에서 아주 많이 사용되고 있다.¹⁸⁾ 그러나, 인간포미바이러스의 integrase는 Ni²⁺-킬레이트 컬럼을 이용한 단 한번의 정제로는 비특이적인 nuclease를 완전히 제거할 수 없다. Fluegel 그룹도 Ni²⁺-킬레이트 컬럼으로 1차 정제 후, 추가적으로 Mono S 컬럼을 이용한 HPLC 정제를 통하여 포미바이러스 integrase를 사용하였다.^{15,16)} 그러나, 그들의 정제는 2단계의 정제에도 불구하고 많은 양의 비특이적인 nuclease 활성이 남아있어, 포미바이러스 integrase의 정량적인 생화학적 특성을 연구하기에는 미흡하였다. 본 연구에서는 Ni²⁺-킬레이트 컬럼 정제 후에 SP-sepharose 이온교환 컬럼을 이용하여 추가적인 정제를 통하여 이러한 문제점을 극복하였다. Fig. 1B는 단백질의 정제 단계를 보여 주는 것으로, 2번 라인은 IPTG에 의하여 처리

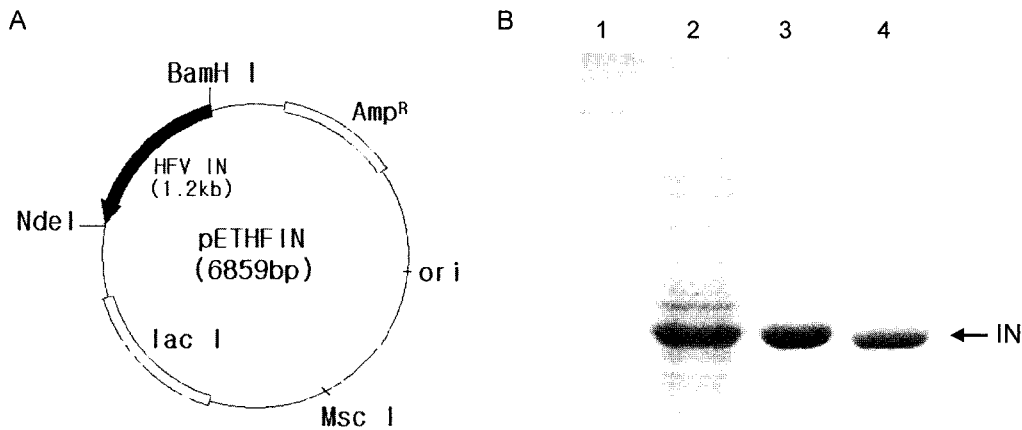


Fig. 1 – Construction of an HFV-integrase expression vector and purification of the protein. A. Schematic diagram of the pETHFIN construct to express HFV integrase. The cDNA (1.2 kb) of HFV integrase was introduced into the NdeI/BamHI site of the pET15b. B. SDS-PAGE analysis of purified HFV integrase. Purified integrase was separated by a 12.5% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue stain. Lane 1; protein molecular size markers (32.5, 47.5, 83.0, and 175.0 kDa from the bottom of the gel), lane 2; soluble extracts from the IPTG-induced BL21(DE3) lysate, lane 3; HFV integrase purified by Ni²⁺-chelated column, lane 4; HFV integrase purified by SP-sepharose.

된 대장균에서 분자량 43 kDa의 integrase 단백질의 생산이 대량으로 유도되는 것을 볼 수 있다. 3번 라인에서는 Ni²⁺-킬레이트 컬럼으로 정제된 단백질로서 95% 이상의 순도를 보여주고, 4번 라인은 추가적으로 SP-sepharose 컬럼으로 정제된 단백질로서, 3번 라인에 보여주던 3개의 오염된 단백질 밴드가 제거되었음을 알 수 있다. IPTG에 의하여 integrase의 생산이 유도된 대장균 2리터의 배양액에서 약 5 mg의 인간포미바이러스 integrase를 얻을 수 있었다. 이런 결과는 상대적으로 용해성이 낮은 인간면역결핍바이러스 integrase에 비하여 약 3배 이상 많이 생산되었다.¹⁸⁾ 본연구에서는 4번 라인의 단백질을 이용하여 인간 포미바이러스 integrase의 생화학적 특성을 조사하였다.

포미바이러스 integrase 효소활성의 생화학적 조건

리트로바이러스의 integrase들은 효소활성의 발현을 위하여 조효소로서 Mn²⁺이나 Mg²⁺을 반드시 필요로 한다.^{19,20)} 그러나, 대부분의 리트로바이러스 integrase는 주로 Mn²⁺를 조효소로 사용하고 있고, Mg²⁺을 조효소로 사용하는 경우 효소활성이 감소되는 것을 볼 수 있으며, 또한 적정 농도 이상의 조효소를 사용하는 경우, 정제된 효소 단백질 집합에 존재하는 비특이적인 nuclease의 활성을 자극하여 특이적인 효소 활성의 작용을 방해한다.^{21,22)} 따라서, 본연구에서도 정제한 인간 포미바이러스 integrase의 조효소에 대한 선호성과 효소활성 발현에 필요한 조효소의 최적농도를 먼저 조사하였다(Fig. 2). Mn²⁺과 Mg²⁺이온의 농도를 각기 1, 5, 10 mM로 증가시키며 endonucleolytic 활성(Fig. 2A)과 disintegration 활성(Fig. 2B)을 조사하였을 때, 포미바이러스의 integrase의 두 활성은 모두 Mn²⁺ 이온을 절대적

인 조효소로 사용하고있음을 보여준다. 반면에 Mg²⁺ 이온은 조효소로서 endonucleolytic 활성 발현에 전혀 작용할 수 없으며, disintegration 활성의 발현에 매우 미약하게 작용하고 있음을 보여준다. 그러나, 다른 리트로바이러스 integrase의 활성 연구에서 밝혀진 것과 같이 disintegration 활성은 상대적으로 기질 특이성이 떨어지는 것을 고려할 때, 인간포미바이러스는 Mg²⁺을 전혀 조효소로 사용할 수 없다고 추정된다. 효소발현에 필요한 적정 Mn²⁺의 농도는 각 반응의 진행 정도와 비특이적인 반응의 억제 정도를 감안할 때 약 5 mM로 조사되었다. 또한 이들의 반응의 결과에 있어서 17mer 이하의 올리고핵산이 거의 관측되지 않아, 본연구자들이 채택한 Ni²⁺-킬레이트 컬럼과 SP-sepharose 컬럼의 2 단계의 정제가 Flugel 그룹이 사용한 Ni²⁺-킬레이트 컬럼과 Mono S를 사용한 HPLC의 2단계의 정제보다 훨씬 더 비특이적인 nuclease의 오염을 효과적으로 제거할 수 있었다(Fig. 2).

반응시간에 따른 endonucleolytic 효소반응의 진행 정도를 20 mM HEPES(pH 7.5) 완충용액에서 5 mM Mn²⁺ 존재하에 10 nM 기질과 300 nM 단백질로 조사하였을 때, 5, 30, 60, 90, 120 분에 각기 전체 기질의 16.0, 58.4, 75.6, 79.8, 79.4%가 18mer로 전환되어, 반응 초기 30분에 약 60% 정도 진행되고, 반응 60분이면 거의 반응이 종결되고 있음을 알 수 있다(Fig. 3). 용액 중에서 integrase는 대부분 monomer로 존재하며, 극히 일부만이 이량체나 사량체 등의 복합체로 존재한다. 기질에 작용하여 효소활성을 나타내는 것은 이량체나 사량체로 알려져 있다.²³⁾ 따라서, integrase의 효소반응은 다른 효소들의 반응과는 달리 기질의 양에 비하여 과량의 효소를 사용하며, 용액 중의 대다수를 차지하는 단량체들이 기질에 먼저 결합하여 이량체나 사량체에

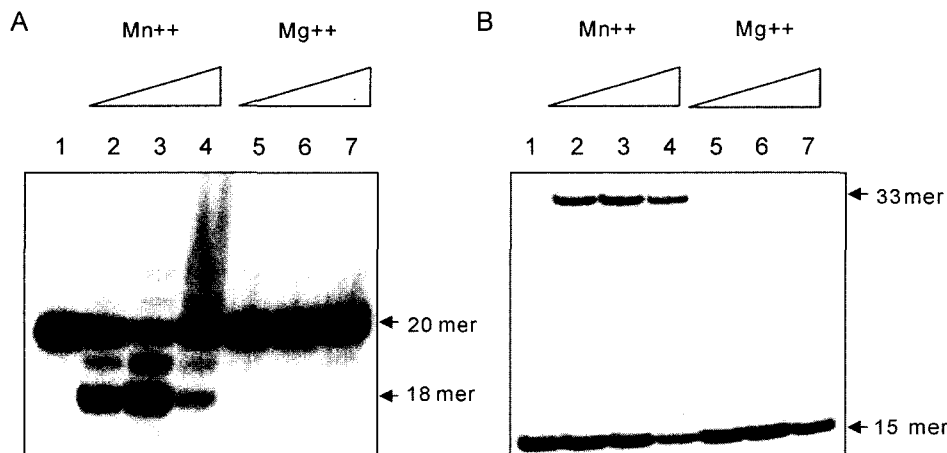


Fig. 2 – Enzymatic activities of HFV integrase in the presence of divalent cations as cofactors. A. Endonucleolytic activities of HFV integrase. The radiolabeled substrates of 10 nM were incubated 37°C for 60 min with purified integrase of 300 nM in the presence of Mn²⁺ or Mg²⁺ of the concentration indicated above. Conversion of the 20mer oligonucleotide to the 18mer was analyzed in a 15% polyacrylamide gel. Lane 1; no divalent cation, lanes 2, 3, and 4; 1, 5, and 10 mM Mn²⁺ as final concentrations, respectively, lanes 5, 6, and 7; 1, 5, and 10 mM Mg²⁺ as final concentrations, respectively. B. Disintegration activities of HFV integrase. Conversion of the 15mer oligonucleotide in a Y-shaped disintegration substrate to the 33mer was analyzed. The reaction conditions in each lane are same as described above.

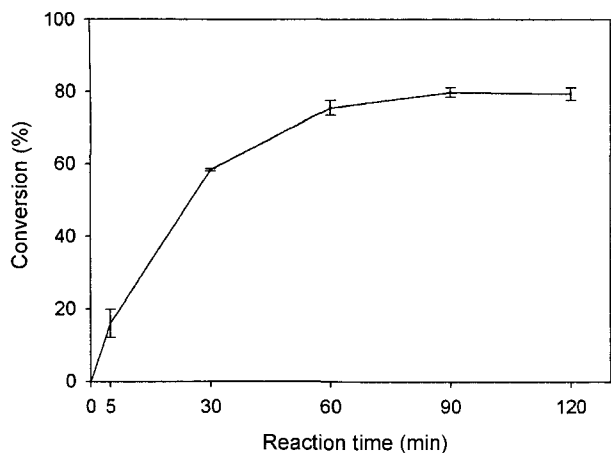


Fig. 3 – Endonucleolytic reaction of HFV-integrase in the various reaction times. The radiolabeled substrates of 10 nM were incubated at 37°C with purified integrase of 300 nM in the presence of 5 mM Mn²⁺ for various reaction times. Conversion of the 20mer oligonucleotide to the 18mer was analyzed by quantitating the radioactivity of the bands in a dried gel using a phosphoimage analyzer. Each point represents the mean ± S.E.M. (n=4).

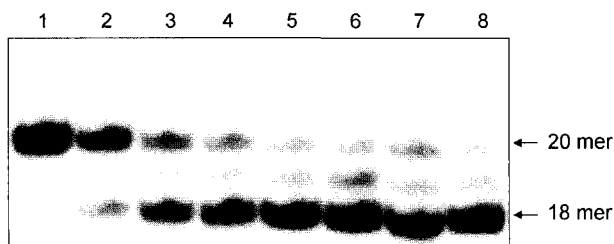


Fig. 4 – Effect of reaction pH on endonucleolytic activities of HFV-integrase. The reactions containing 10 nM substrates and 300 nM integrase were performed in the buffers described below. Lane 1; 20 mM HEPES (pH 7.5) without addition of integrase, lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8; MES (pH 6.0), MOPS (pH 6.5), MOPS (pH 7.0), HEPES (pH 7.5), Tris (pH 8.0), TAPS (pH 8.5), and CHES (pH 9.0), respectively.

의하여 기질들의 생성물로의 완전히 전환되는 것을 억제하는 것 같다.

Fig. 4에서는 반응용액의 pH 변화에 따른 포미바이러스 integrase의 효소활성을 조사하였다. Endonucleolytic 활성은 pH 6.0에서 약 24.2%, pH 6.5에서 62.0%, pH 7.0~9.0에서 75~85%로서, 포미바이러스 integrase는 pH 7.0 미만에서는 효소의 활성이 pH 7.0 이상에서 보다 상대적으로 약한 것으로 밝혀졌다. 이런 결과는 murine leukemia 바이러스 integrase가 pH 6.5를 중심으로 최대의 활성을 보이는 것과는 비교되지만, 인간면역결핍바이러스가 pH 7.5를 중심으로 최대의 활성을 보이는 것과는 잘 일치되고 있다.^{19,24)}

리트로바이러스의 integrase는 바이러스의 증식을 위하여 반

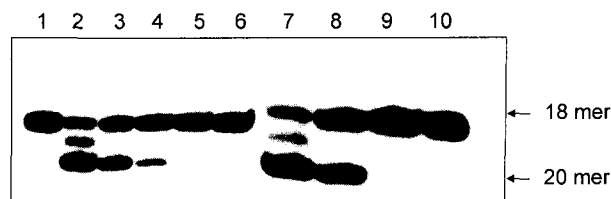


Fig. 5 – Inhibition of endonucleolytic activities of HFV-integrase by baicalein and chicolic acid. The reactions containing 10 nM substrates and 300 nM integrase were performed for 60 min in the presence of baicalein or chicolic acid. Lane 1; no integrase and no inhibitor, lane 2; no inhibitor, lanes 3, 4, 5, and 6; 0.1, 1, 10, and 100 μM baicalein as final concentrations, respectively, lanes 7, 8, 9, and 10; 0.01, 0.1, 1, and 10 μM chicolic acid as final concentrations, respectively.

드시 필요한 효소이다. 따라서, 이효소의 활성을 차단할 수 있는 약물은 바이러스의 증식을 억제하여 바이러스의 의한 질병의 발생을 억제할 수 있다. 이런 이유에서 인간 면역결핍바이러스의 integrase의 활성을 차단할 수 있는 약물의 개발이 매우 활발하다. Chicolic acid와 baicalein은 인간 면역결핍바이러스 integrase의 활성을 효과적으로 차단할 수 있는 약물로서, IC₅₀가 각각 0.1, 1.2 μM로 알려져있다.²⁵⁾ 본연구에서 정제한 인간포미바이러스 integrase에 chicolic acid와 baicalein를 각기 투여하고, endonucleolytic 활성이 억제되는 정도를 조사하여 보았을 때, 이약물들의 IC₅₀가 약 0.13, 0.25 μM로 나타나, 포미바이러스의 integrase도 인간 면역결핍바이러스 integrase의 효소활성을 억제하는 약물들에 의하여도 유사한 수준에서 억제되는 것으로 사료된다 (Fig. 5).

후천성면역결핍증은 2003년 말 현재 약 5000만명이 감염되어 있고 약 1000만명의 환자가 존재하고 있다. 에이즈의 발병 억제와 치료를 위하여 많은 약물들이 개발되어 있으나, 아직까지 완전히 바이러스의 증식을 차단하고, 질병을 치료할 수 있는 약물은 개발되어 있지 않다. 그러나, 최근에 개발된 방법으로 약물의 바이러스 내의 목표를 달리하는 2중 이상의 약물의 복합처방은 바이러스의 증식을 상당기간 억제하며, 보균자의 발병과 환자의 질병 진행을 상당히 억제하는 효과를 보이고 있다.²⁶⁾ 따라서 integrase 효소활성을 차단하는 약물의 개발은 에이즈 질병 치료에 중요한 발판이 될 수 있다. 그러나, 인간 면역결핍바이러스 integrase의 용해도는 매우 낮아, 용액 중에서 쉽게 침전되어 대량으로 활성억제제의 탐색에 어려움을 주고 있다.¹⁹⁾ 따라서, 포미바이러스 integrase와 면역결핍바이러스 integrase의 생화학적인 특성이 유사하고, 활성억제제에 대한 반응이 유사하다면, 용액 중에서 용해도가 좋은 인간포미바이러스의 integrase를 활성억제제의 탐색에 이용하는 것도 유용한 약물을 단시간에 효과적으로 검색할 수 있는 한 가지 방법이 될 수 있을 것이다.

결 론

1. 인간포미바이러스 integrase의 유전자를 클로닝하고, 대장균에서 발현하여, 2단계 정제를 통하여 비특이적인 nuclease의 활성이 거의 제거된 효소를 얻었다.

2. 인간포미바이러스 integrase 효소활성의 최적 조건을 조사하였을 때, 5 mM Mn^{+2} 에서 pH 7.5~8.5인 것으로 판명되었다.

3. 인간포미바이러스 integrase에 대한 cholic acid와 baicalein의 IC_{50} 가 각각 0.13, 0.25 μM 로 면역결핍바이러스 integrase에 대한 IC_{50} 와 유사하여, 항integrase 탐색에 이용할 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2003학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다. 본 연구에 사용된 유전자증폭기(My Genie 96, Bioneer)은 중앙대학교 연구기자재 구입 프로그램으로 도입되었다.

문 헌

- Malmquist, W. A., van der Maaten, M. J. and Boothe, A. D. : Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron-microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* **29**, 188 (1969).
- Riggs, J. L., Oshiro, L. S., Taylor, D. O. N. and Lennette, E. H. : Syncytium-forming agents isolated from domestic cats. *Nature (London)* **222**, 1190 (1969).
- Hooks, J. J. and Gibbs, C. J. : The foamy viruses. *Bacteriological Reviews* **39**, 169 (1975).
- Flugel, R. M. : Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **4**, 739 (1991).
- Achong, B. G., Mansell, P. W. A., Epstein, M. A. and Clifford, P. : An unusual virus from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **46**, 299 (1971).
- Prince, A. M., Williams, B. A. A., Huima, T., Bardina, L. and Brotman, B. : Isolation of a virus from chimpanzee liver cell cultures inoculated with sera containing the agent of non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **11**, 1071 (1984).
- Coffin, J. M. : Replication of retroviridae, In B. N. Fields (ed.) *Virology*. Raven Press, New York, p. 1437 (1990).
- Goff, S. P. : Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 527 (1992).
- Cobrinik, D. R., Katz, R., Terry, R., Skalka, A. M. and Leis, J. : Avian sarcoma and leucosis virus pol endonuclease recognition of the tandem long terminal repeat junction: minimum site required for cleavage is also required for viral growth. *J. Virol.* **61**, 1999 (1987).
- Colicelli, J. and Goff, S. P. : Sequence and space requirements of a retrovirus integration site. *J. Mol. Biol.* **199**, 49 (1988).
- 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).
- 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).
- Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. : HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**, 1211 (1991).
- Chow, S. A., Vincent, K., Ellison, V. and Brown, P. O. : Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* **255**, 723 (1992).
- Pahl, A. and Flugel, R. M. : Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus. *J. Virol.* **67**, 5426 (1993).
- Pahl, A. and Flugel, R. M. : Characterization of the human spuma Retrovirus integrase by site-directed mutagenesis, complementation analysis, and by swapping the zinc finger domain of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 2957 (1995).
- Netzer, K. O., Schliephake, A., Maurer, B., Watanabe, R., Aguzzi, A. and Rethwilm, A. : Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* **192**, 336 (1993).
- 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).
- Sherman, P. A. and Fyfe, J. A. : Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5119 (1990).
- Ellison, V. and Brown, P. O. : A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7316 (1994).
- Wolfe, A. L., Felock, P. J., Hastings, J. C., Blau, C. U. and Hazuda, D. J. : The role of manganese in promoting multimerization and assembly of human immunodeficiency virus type 1 integrase as a catalytically active complex on immobilized long terminal repeat substrates. *J. Virol.* **70**, 1424 (1996).
- Engelman, A. and Craigie, R. : Efficient magnesium-dependent human immunodeficiency virus type 1 integrase activity. *J. Virol.* **69**, 5908 (1995).
- Jones, K. S., Coleman, J., Merkel, G. W., Laue, T. M. and Skalka, A. M. : Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J. Biol. Chem.* **267**, 16037 (1992).

- 24) Dotan, I., Scottoline, B. P., Heuer, T. S. and Brown, P. O. : Characterization of recombinant murine leukemia virus integrase. *J. Virol.* **69**, 456 (1995).
- 25) Fesen, M. R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J. and Kohn, K. W. : Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 595 (1994).
- 26) Richman, D. D. : HIV therapeutics. *Science* **272**, 1886 (1996).