

인간 포미바이러스 인테그라제 돌연변이의 특성

강승이 · 오수아 · 이학성 · 한성태 · 신차균*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과, 중앙대학교 생명환경연구원
(Received January 12, 2005; Revised March 18, 2005)

Characterization of Human Foamy Virus Integrase Mutant

Seung Yi Kang, Soo A Oh, Hak Sung Lee, Sung Tai Han and Cha-Gyun Shin*

Department of Biotechnology and BET Research Institute, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

Abstract — Human foamy virus (HFV) integrase mediates integration of viral c-DNA into cellular DNA. In this process, HFV integrase recognizes its own viral DNA specifically and catalyzes insertion of viral c-DNA. In order to study catalytic domains and residues, three deletion mutants and two point mutants of HFV integrase were constructed and analyzed with respect to enzymatic activities. The C-terminal deletion mutant showed decreased enzymatic activities while the N-terminal deletion mutant lost the activities completely, indicating that the N-terminal domain is more important than the C-terminal domain in enzymatic reaction. The point mutants, in which an aspartic acid at the 164th position or a glutamic acid at the 200th position of the HFV integrase protein was changed to an alanine, lost the enzymatic activities completely. However, they were well complemented with other defective deletion mutants to recover enzymatic activities partially. Therefore, these results suggest that the aspartic acid and glutamic acid at the respective 164th and 200th positions are catalytic residues for enzymatic reaction.

Keywords □ HFV, integrase, deletion, point mutant

레트로바이러스는 생물학적 특성과 구조적 특성에 따라 oncovirus, lentivirus, spumavirus로 분류한다. Oncovirus와 lentivirus group은 인간과 동물에서 암, 면역결핍증과 같은 치명적 질병을 일으키는 관계로 많은 연구가 되어있다. Spumavirus는 최근에 여러 질병에서 발견되어 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다.¹⁻⁴⁾ 인후암 환자에서 처음 발견된 후, 간염환자에게서도 발견되고 있어 인간에게 질병을 유발할 수 있는 가능성을 보여주고 있는 인간 포미바이러스(human foamy virus, HFV)는 spumavirus의 하나로서, 유전자의 구성에 있어서 일반적인 레트로바이러스 유전자 구성과 유사한 형태를 보이고 있다.^{5,6)} HFV는 약 12 kb의 동일한 2개의 RNA를 바이러스 유전자로 보유하여, 레트로바이러스 중에서 가장 큰 유전자를 함유한다. 바이러스가 인간세포의 원형질에 침투한 후, RNA 유전자는 역전사효소에 의하여 이중나선의 DNA로 전환된다. 이 DNA는 세포 핵

안으로 이동하고, 세포의 유전자 안으로 삽입된다. 바이러스 유전자가 복제되고, 자손바이러스를 생산하기 위해서는 바이러스 유전자의 세포 유전자로의 중합이 필수불가결하며, 이러한 과정은 바이러스 특유의 효소, 인테그라제에 의하여 매개된다.^{7,8)}

레트로바이러스의 인테그라제는 *in vitro*에서 3가지의 촉매적 활성이 있다.⁹⁻¹²⁾ 첫째, endonucleolytic 활성은 바이러스 DNA의 끝 부분의 3'-말단의 2개의 핵산을 제거하는 활성으로서, 바이러스 DNA의 끝 부분의 염기서열을 갖는 짧은 이중나선의 올리고핵산을 기질로 사용하여 측정할 수 있다. 둘째, strand transfer 활성으로 인테그라제는 3'-말단의 2개의 핵산이 절단된 이중나선의 올리고핵산을 다른 DNA에 집어넣는다. 셋째, 인테그라제는 disintegration 활성을 나타낸다. 바이러스 유전자가 세포 유전자에 중합된 형태와 같은 Y-모양의 합성된 이중나선의 올리고핵산에 인테그라제를 첨가하면 선택적으로 바이러스 DNA에 해당하는 부분을 끊어낸다. 이러한 활성들은 방사능으로 표식된 올리고핵산을 이용하여 선택적으로 측정할 수 있다.¹²⁾

레트로바이러스의 인테그라제들의 구조는 기능적으로 3개의 부분(N-말단영역, 중앙영역 및 C-말단영역)으로 구분한다.^{13,14)}

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

N-말단 영역은 Zn-finger 영역(His-His-Cys-Cys)이 존재하며, 인테그라제가 작용할 때 이량체 또는 다량체를 형성하게 한다. 중앙영역은 효소활성을 나타내는 영역으로, N-말단영역과 함께 다른 모든 레트로바이러스에서 아미노산 서열이 잘 보존되어 있다. HFV의 인테그라제에서 64번 aspartic acid, 116번 aspartic acid 및 152번 glutamic acid는 효소활성과 직접 관련되는 잔기들로써, 이들의 돌연변이는 효소활성을 완전히 상실하게하며, 이 잔기들의 돌연변이 바이러스들은 defective하다. 그러나, DNA-결합영역으로 알려진 C-말단영역은 상대적으로 아미노산 서열이 덜 보존되어 있다.^{13,14)}

371개의 아미노산으로 구성된 HFV의 인테그라제는 면역결핍 바이러스, Rous sarcoma 바이러스 등의 인테그라제가 많이 연구된 것에 비하여, 거의 연구되어 있지 않다. Pahl과 Flugel이 박테리아에서 발현한 HFV 인테그라제가 효소활성이 있음을 최초로 보고한 이후, 더 진전된 연구가 보고되지 않고 있다.^{15,16)}

본 연구에서는 HFV 인테그라제의 효소활성 영역의 특성과 촉매적 잔기에 관한 것으로서 기존에 알려진 인간 면역결핍바이러스 인테그라제의 염기서열과 HFV 인테그라제의 염기서열을 비교하여 포미바이러스 인테그라제의 N-말단, C-말단이 제거된 돌연변이들과 촉매적 잔기가 치환된 돌연변이를 제작하여 이들의 활성을 비교 분석하여 포미바이러스 인테그라제의 효소활성에 관련된 단백질 영역과 촉매적 잔기를 조사하였다.

실험 방법

시약 및 재료

각 돌연변이 인테그라제의 생산을 위한 발현벡터 제작과 효소 활성을 측정하기 위한 기질로 사용된 올리고핵산들은 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 구입하였다. 인테그라제 단백질 정제와 관련된 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

발현벡터 제작

HFV의 돌연변이 인테그라제를 생산하기 위한 발현벡터는 정상적인 인간 포미바이러스 인테그라제를 생산하는 벡터로서, 이전에 본 실험실에서 이미 발표한 pETFIN을 template로 하여 PCR 방법으로 제작하였다.¹⁷⁾ HFV 인테그라제의 deletion 돌연변이의 N-말단, 중앙영역, C-말단의 설정은 인간 면역결핍바이러스 인테그라제의 아미노산과 비교 분석하여 결정하였으며, Fig. 1에 도식화하였다. HFV 인테그라제의 N-말단 deletion 돌연변이(HFIN Δ N)의 유전자는 5'-말단 쪽에 HFIN89S(5'-AACAAA-

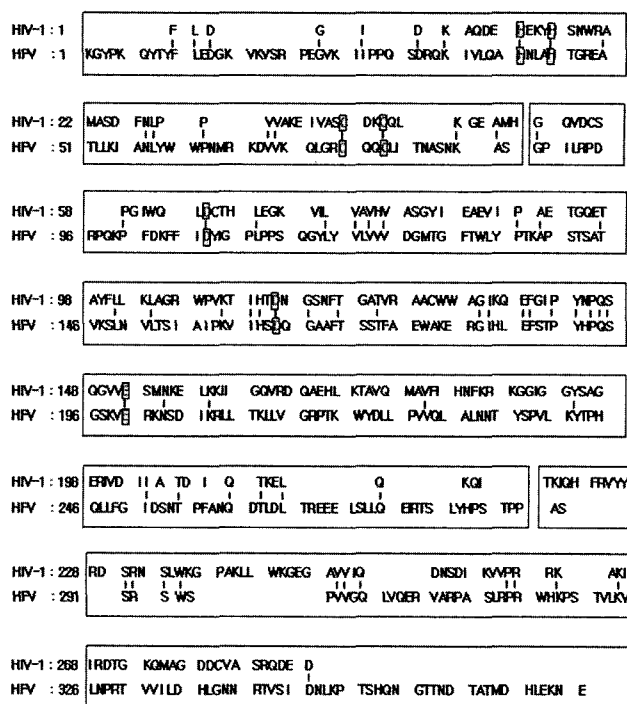


Fig. 1 - Comparison of amino acid sequences between HIV-1 and HFV integrases. The N-terminal, central, and C-terminal domains are represented by boxes in serial order. Vertical lines indicate identical amino acids between the two proteins. The highly conserved HHCC and DD(35)E motifs in the two sequences are indicated by small rectangles.

CATATGGGTCCTATTCTAAGACCAGAT-3')과 3'-말단 쪽에 FC(5'-GTATAATTGGATCCTTCTGCTGTTTCAGTCACAG-3')를 primer로 사용하여 증폭하였고, HFV 인테그라제의 C-말단 deletion 돌연변이(HFIN Δ C)의 유전자는 5'-말단 쪽에 FN(5'-CAGGGTCCATATGAAAGGATATCCCAAACAATATAC-3')과 3'-말단 쪽에 HFIN288A(5'-GGAACGGGATCCTTATGGAGGGG-TGGATGGATGGTA-3')를 primer로 사용하여 증폭하였다. N-말단과 C-말단이 모두 제거되고 중앙영역만 함유하는 돌연변이(HF89)의 유전자는 5'-말단 쪽에 HFIN89S(5'-AACAAACATATGGGTCCTATTCTAAGACCAGAT-3')과 3'-말단 쪽에 HFIN288A(5'-GGAACGGGATCCTTATGGAGGGGTGGATGGATGGTA-3')를 primer로 사용하여 증폭하였다. 이상의 각각의 증폭된 유전자는 *Nde*I과 *Bam*HI로 처리하고, 미리 준비된 pET15b 발현벡터에 도입하여 제작하였다.

특정한 한 아미노산 만이 치환된 point mutant는 overlapping PCR 방법으로 제작하였다.¹⁸⁾ 포미바이러스 인테그라제의 164번 aspartic acid가 alanine으로 치환된 D164A의 유전자는 2단계의 PCR로 제작하였다. 1단계로 5'-말단 쪽에 FN과 3'말단 쪽에 HFD164AA(5'-AGTGAATGCTGCACCTTGAGCAGAGTGAA-TCACCTT-3')를 primer로 사용하여 앞쪽 부분의 유전자를 증폭

하고, 5'-말단 쪽에 HFD164AS(5'-AAGGTGATTCACTCTGCT-CAAGGTGCAGCATTCACT-3')과 3'-말단 쪽에 FC를 primer로 사용하여 뒷쪽 부분의 유전자를 증폭하였다. 각각의 증폭된 유전자를 동량 섞고 100배 희석한 후 이를 template로 하고 FN과 FC를 primer로 하여 2단계 PCR을 실시하여 D164A의 전체 유전자를 제작하였다. 또한 포미바이러스 인테그라제의 200번 glutamic acid가 alanine으로 치환된 E200A의 유전자도 같은 방법으로 제작되었다. 먼저 1단계로 5'-말단 쪽에 FN과 3'-말단 쪽에 HFE200AA(5'-TATATCACTATTTTTTCCTTGCCACCTTACTACCACT-3')을 primer로 사용하여 앞쪽 부분의 유전자를 증폭하고, 5'-말단 쪽에 HFE200AS(5'-AGTGGTAGTAAGGTGGC-AAGGAAAAATAGTGATATA-3')과 3'-말단 쪽에 FC를 primer로 사용하여 뒷쪽 부분의 유전자를 증폭하였다. 각각의 증폭된 유전자를 동량 섞고 100배 희석한 후 이를 template로 하고 FN과 FC를 primer로 하여 2단계 PCR을 실시하여 E200A의 전체 유전자를 제작하였다. 각각의 증폭된 전체 유전자를 *Nde*I과 *Bam*HI으로 처리하고, 미리 처리된 pET15b 발현벡터에 도입하였다. 유전자의 증폭에서는 비특이적 돌연변이를 최소화하기 위하여, pfu polymerase를 이용하였으며, 제작된 각 발현벡터의 정확한 염기서열은 DNA sequencing으로 확인하였다.

단백질의 정제

각 인테그라제 단백질의 정제는 각각의 pET 발현벡터를 함유하는 대장균 [BL21(DE3)] 균주를 이용하였으며, 자세한 정제 과정은 본 실험실에서 이전에 발표한 방법과 동일하다.¹⁷⁾ 정제된 인테그라제는 SDS-PAGE로 분석하였고 Bradford assay로 정량하였다.

기질 제작 및 효소 활성 측정

Endonucleolytic 반응 기질은 바이러스 DNA의 끝의 염기서열과 동일한 20 bp의 이중가닥 올리고핵산을 한쪽 부분의 5'-말단에만 방사능으로 표식하여 기질로 사용하였다.^{15,19)} 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 polynucleotide kinase로 37°C에서 15분간 처리하고, 0.5 M EDTA와 5 M NaCl 1 μ l을 첨가하고, 120 pmol의 올리고핵산 FV1 (U5-LTR, +strand; 5'-ATTGTCATGGAATTTTGTAT-3')을 넣은 후, 3분간 100°C에서 가열하고 천천히 식히고, 반응액을 Biospin-6를 통과시켜, 반응하지 않은 γ -³²P-ATP를 제거하였다.¹⁹⁾

Strand transfer 활성의 측정을 위한 기질은 18mer인 FV3(5'-ATACAAAATTCATGACA-3')를 위에서와 같은 방법으로 방사능으로 표식하고 20 mer인 FV1과 상보적인 결합이 일어나게 하

여 제작하였다.²⁰⁾

Disintegration 활성의 측정에 사용되는 기질로써는 Y-모양의 사중 올리고핵산은 다음과 같이 제작하였다. 15 mer인 올리고핵산 FT1(5'-GAGCAACGCAAGCTT-3')을 위에서와 같은 방법으로 방사능을 표식하고, 33 mer인 FT2(5'-GTAGTCGACCTGC-AGCCCAAGCTTGCCTTGTCTC-3')와 36 mer인 FV3(5'-ATACAAAATTCATGACAGGGCTGCAGGTGACTAC-3'), 20 mer인 FV1을 넣어서 상보적인 결합이 일어나게 하여 제작하였다.²⁰⁾

Endonucleolytic 활성, strand transfer 활성 및 disintegration 활성의 측정은 기본적으로 20 mM HWPES[pH 7.5], 5 mM MnCl₂, 10 mM DTT, 0.05% NP40, 1 mM CHAPS, 및 0.01 mM EDTA를 함유하는 반응용액 10 μ l에, 방사능으로 표식된 각각의 기질 0.1 pmol과 효소 3 pmol을 넣고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 두 개의 다른 효소를 한 반응에 투여하는 complementation 반응에서는 각각의 효소의 양을 1.5 pmol씩 미리 섞은 후 투여하였다. 반응 후, 5 μ l의 정지용액(95% formamide, 18 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)을 첨가하여 정지시키고 90°C에서 3분간 가열한 후 15% acrylamide gel에서 분석하였다. Endonucleolytic 활성은 방사능으로 표식된 20 mer의 올리고핵산 기질이 18 mer로 전환되는 정도를 건조한 전기영동 젤을 phosphoimage analyzer(GS-525, Bio-Rad)에서 정량하여 조사하였다. Strand transfer 활성은 18 mer의 기질이 더 큰 크기의 올리고핵산으로 전환되는 것을 측정하여 판단하였으며, disintegration 활성은 방사능으로 표시된 15 mer의 올리고핵산 기질이 33 mer로 전환되는 것을 조사하여 측정하였다.^{19,20)}

결과 및 고찰

인간 포미바이러스 인테그라제의 단백질 영역 분석

레트로바이러스의 인테그라제 유전자는 대부분의 경우 바이러스의 pol 유전자의 끝부분에 붙어있으며, 인테그라제 단백질은 gag-pol 또는 pol 유전자의 발현으로 polyprotein으로 생성되어 바이러스 assembly 과정에서 바이러스 입자가 감염 세포의 막에서 성숙되어 지는 과정에서 단백질 분해 효소에 의하여 polyprotein에서 절단되어 활성화된다. 레트로바이러스 인테그라제에 대한 많은 연구는 인테그라제 단백질의 N-말단과 중앙영역은 아미노산 서열이 레트로바이러스 사이에서 매우 보존적이며, 유사한 서열을 갖고 있음을 보여준다.^{21,22)} 본 연구에서는 아직 정확한 기능적인 단백질 영역과 촉매적 잔기가 규명되어 있지않은 인간 포미바이러스 인테그라제의 단백질 영역과 촉매적 잔기를 규명하기 위하여, 기존에 단백질 영역과 촉매적 잔기가 밝혀져 있는 인간 면역결핍바이러스 인테그라제의 아미노산 서열과 HFV 인테그라제의 아미노산 서열을 보존적인 아미노산을 중심으로 비교 분석하였다(Fig. 1). 이러한 분석은 포미바이러스 인테그라제의

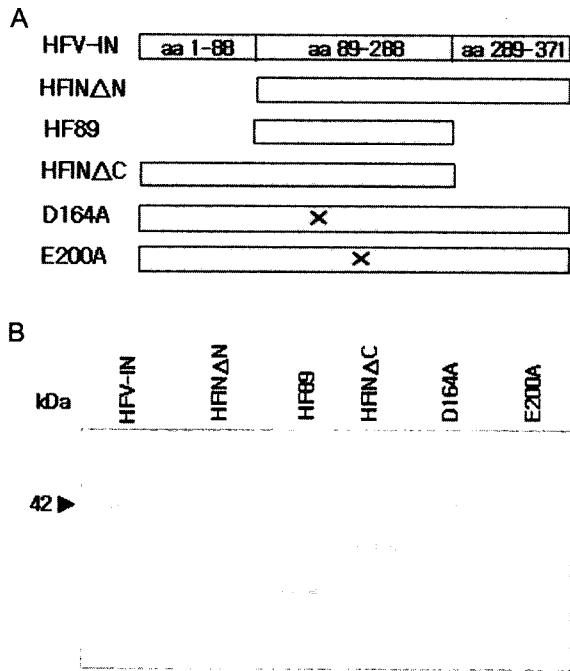


Fig. 2 – Construction of HFV integrase mutants and SDS-PAGE gel electrophoresis of the proteins. A. Primary structures of HFV integrase mutants. The HFV integrase protein was dissected into three functional domains by comparatively analyzing amino acid sequences between HIV and HFV integrases as shown in Fig. 1. B. SDS-PAGE analysis of purified HFV integrase proteins. The purified integrase was separated by a 12.5% SDS-PAGE and visualized by a Coomassie blue stain.

N-말단영역은 Zn-finger 영역을 형성하는 HHCC motif를 포함하여 아미노산 1번에서 88번까지로, 중앙영역은 레트로바이러스 인테그라제에서 촉매적 잔기의 그룹으로 알려진 DD(35)E motif를 포함하여 89번에서 288번까지로, C-말단영역은 상대적으로 보존적인 아미노산들이 적은 289번에서 371번까지로 결정할 수 있게 하였다. 또한 아미노산 서열의 비교 분석은 인간 면역결핍바이러스 인테그라제에서 촉매적 잔기인 64번 aspartic acid, 116번 aspartic acid 및 152번 glutamic acid는 포미바이러스 인테그라제에서는 107번 aspartic acid, 164번 aspartic acid 및 200번 glutamic acid로 조사되었다. 따라서 포미바이러스 인테그라제 단백질 영역의 이러한 결과를 검증하기 위하여 각 영역이 제거된 deletion 돌연변이 3개와, 164번 aspartic acid 또는 200번 glutamic acid가 각각 alanine으로 치환된 점 돌연변이 2개를 제작하였다(Fig. 2A).

인테그라제의 정제

각각의 돌연변이 유전자들은 pET15b 발현벡터에 클로닝하였다. 인테그라제 단백질의 정제는 발현벡터에서 클로닝한 재조합 단백질의 N-말단에 붙게한 histidine tag를 이용하여 Ni²⁺-킬레

이트 컬럼과 SP-sepharose 컬럼으로 수행하였다. Histidine tag를 이용한 재조합 단백질의 정제는 6~10개의 histidine이 반복된 단백질 부분이 Ni²⁺-킬레이트 지지체에 선택적으로 결합하는 성질을 이용한 것으로, 단백질에 따라서는 이 방법을 이용한 단 한번의 정제로도 고순도의 단백질을 정제할 수 있는 까닭에, 면역결핍바이러스의 인테그라제를 포함하는, 여러 재조합 단백질들의 정제에서 아주 많이 사용되고 있다.^{19,23)} 그러나, HFV 인테그라제는 Ni²⁺-킬레이트 컬럼을 이용한 단 한번의 정제로는 비특이적인 nuclease를 완전히 제거할 수 없다.^{15,16)} 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 Ni²⁺-킬레이트 컬럼 정제 후에 SP-sepharose 이온교환 컬럼을 사용하였다. 2단계로 정제된 각 단백질들의 최종적인 순도는 SDS-PAGE 분석에 의하면 약 90~95% 정도로 나타났다(Fig. 2B).

포미바이러스 인테그라제 돌연변이의 효소활성

레트로바이러스 인테그라제는 *in vitro*에서 3가지 활성을 보여준다.⁹⁻¹²⁾ 이러한 활성은 바이러스 DNA 유전자의 끝 부분의 염기서열을 닮은 올리고핵산을 이용하여 측정할 수 있다. 바이러

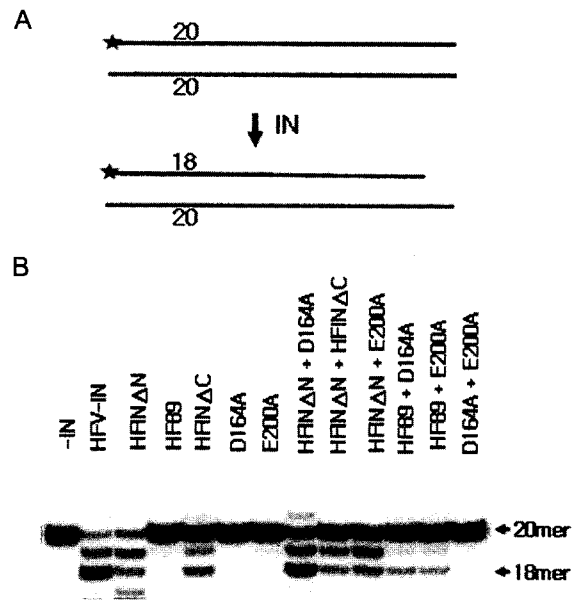


Fig. 3 – Endonucleolytic activities of HFV integrase mutants. (A) Schematic diagram of endonucleolytic reaction. (B) Endonucleolytic reactions of the integrase mutants. A 20 mer oligonucleotide mimicking HFV U5 LTR was labeled with ³²P-γ ATP at its 5'-end, and annealed with its complementary oligonucleotide. The purified substrate of 0.1 pmol was incubated with the integrase marked above of 3 pmol for 60 min at 37°C. In the complementation reactions the two different integrases with an equal amount (1.5 pmol/each) were premixed and added to the reaction. The reaction products were analyzed in a 15% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography. The stars indicate the ends labeled.

스 DNA 유전자의 5'-말단 끝 부분의 2개의 핵산을 선택적으로 제거하는 endonucleolytic 활성의 측정은 바이러스 U5 LTR 끝 부분의 염기서열을 갖고 있으며, 한 쪽부분의 5'-말단에 방사능으로 표식된 20 mer의 이중나선 올리고핵산을 이용하여 실시하였다(Fig. 3A). 포미바이러스 인테그라제는 기질의 90% 이상을 생성물로 바꾸어 매우 강력한 endonucleolytic 활성을 보여주고 있다. 그러나, C-말단이 제거된 돌연변이(HFIN Δ C)는 wild type 인테그라제의 20~30% 정도의 활성을 보여주고 있다. HFIN Δ N은 2개의 핵산을 선택적으로 자르는 특이적인 활성은 없으며, 한 개의 핵산이 자르는 비특이적인 활성을 보여 endonucleolytic 활성이 없는 것으로 판단된다. 또한 중앙영역만 함유하는 HF89와 촉매적 잔기로 판단되는 164번, 200번 아미노산의 점 돌연변이 인테그라제는 전혀 endonucleolytic 활성을 보여 주지 못하고 있다(Fig. 3B). 이러한 결과는 포미바이러스 인테그라제가 작용하기 위하여는 중앙영역만으로는 효소적 활성을 나타낼 수 없고, N-말단 또는 C-말단의 도움이 있어야 효소적 반응을 수행할 수 있음을 나타낸다. 또한 D164A와 E200A의 점 돌연변이가 효소적 활성을 전혀 보여 주지 못한 것은 이들 잔기가 효소 활성 반응의 촉매적 잔기로 참여하고 있다는 것을 증명하고 있다. 효소 활성이 전혀 없는 두 돌연변이를 함께 넣어 반응시킨 complementation 반응에서는 HF89와 D164A 또는 E200A가 효소 활성을 부분적으로 복구하고 있다. 그러나 D164A와 E200A의 complementation 반응에서는 전혀 효소활성이 나타나지 않았다.

인테그라제가 바이러스 DNA를 표적 DNA에 도입하는 활성은 strand transfer 또는 integration 활성이라고 한다. 이 활성은 endonucleolytic 활성 측정에 사용한 기질의 한쪽 올리고핵산의 3'-말단에서 미리 끝 부분의 2개의 핵산이 제거된 기질을 사용하여 측정할 수 있다(Fig. 4A). 또한 strand transfer 활성은 endonucleolytic 반응의 생성물이 다음 단계의 반응으로 일어날 수 있으므로 endonucleolytic 반응에서 측정할 수도 있다(Fig. 3B). HFIN Δ C는 wild type 인테그라제의 strand transfer 활성의 40~50%의 활성을 보여 준다. D164A와 E200A의 점 돌연변이는 전혀 strand transfer 활성을 보여주지 못하여 이들 잔기가 촉매적 잔기로 작용하고 있음을 알 수 있다. 그리고, 이러한 사실은 D164A 점 돌연변이가 strand transfer 활성이 거의 측정되지 않은 HFIN Δ N과의 complementation 반응에서 매우 강력한 활성을 보여주는 것에서 다시 증명되고 있다. Complementation 반응에서 D164A 자체는 효소적인 활성을 상실하였으나, 효소-기질 반응에 필요한 3차원적 구조를 제공하고, HFIN Δ N의 중앙영역은 효소 반응의 촉매적 잔기를 제공하여 효소활성을 나타낼 수 있을 것이다. 또한 이러한 결과는 Fig. 3B의 endonucleolytic 반응에서 관찰된 integration 결과와도 매우 잘 일치하고 있다.

아직 *in vivo*에서는 발견되지 않았으나, *in vitro*에서 관측된 disintegration 활성은 바이러스 DNA가 다른 DNA에 도입되어

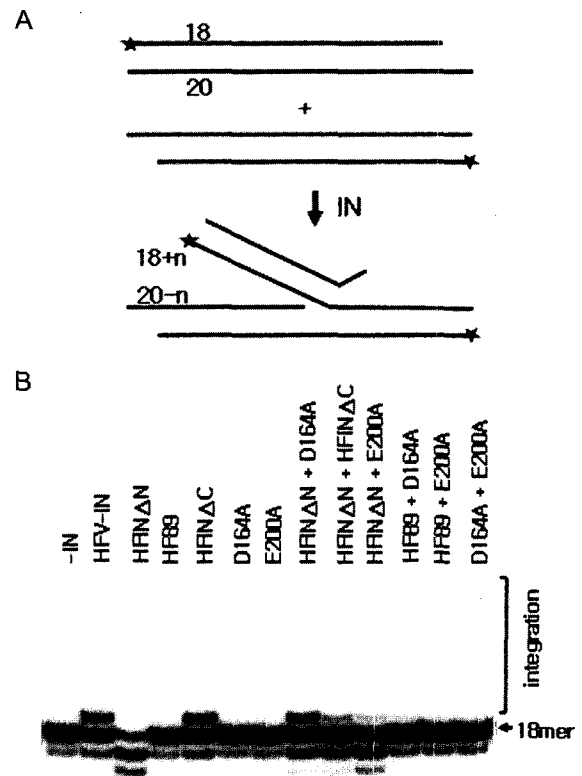


Fig. 4 - Strand transfer activities of HFV integrase mutants. (A) Schematic diagram of strand transfer reaction. (B) Strand transfer reactions of the integrase mutants. An 18mer oligonucleotide (pre-processed) mimicking HFV U5 LTR was labeled with ^{32}P - γ ATP at its 5'-end, and annealed with its complementary oligonucleotide (20 mer). Subsequent treatments are the same as in Fig. 3. The strand transfer products (integration) appeared as bands over the 18 mer.

있는 상태에서 정제한 인테그라제가 바이러스 DNA 부분을 다시 떼어내는 활성이다.¹²⁾ 이활성은 특유의 염기서열을 갖는 4개의 올리고핵산으로 구성된 기질(Y-oligomer)를 사용하여 측정할 수 있다(Fig. 5A). HFIN Δ C는 wild type 인테그라제의 disintegration 활성과 유사한 정도의 강력한 활성을 함유한다. 그러나, 다른 모든 돌연변이들은 전혀 활성이 관측되지 않았다(Fig. 5B). Disintegration 활성이 없는 돌연변이들 사이의 complementation 반응에서는 HFIN Δ N이 점 돌연변이 D164A와 E200A에 각각 상당한 정도의 효소 반응을 보여 주어 서로 보완적으로 작용하고 있다. 또한 중앙영역만 있는 HF89도 점 돌연변이 D164A와 E200A에 약하게 상호보완 작용을 하고 있다.

용액 중에서 인테그라제는 대부분 단량체로 존재하며, 극히 일부분이 이량체나 사량체 등의 복합체로 존재한다. 그러나, 기질에 작용하여 효소활성을 나타내는 것은 이량체나 사량체로 알려져 있다.²⁴⁾ 따라서 각각은 효소활성이 없는 2개의 돌연변이가 complementation 반응에서 활성형의 이량체나 사량체를 형성하여 효소 활성을 보이는 경우, 돌연변이의 특징을 비교하여 원래

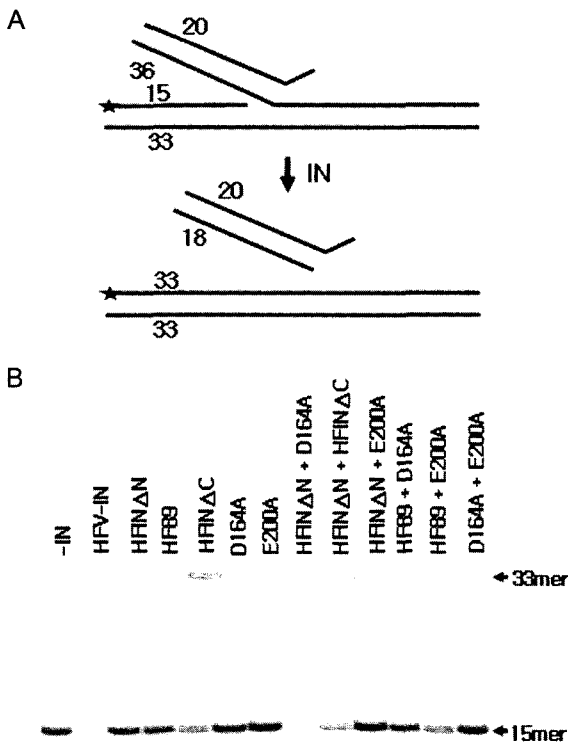


Fig. 5 - Disintegration activities of HFV integrase mutants. (A) Schematic diagram of disintegration reaction. (B) Disintegration reactions of the integrase mutants. The HFV disintegration substrate (Y-oligomer) was prepared by annealing a 5'-end labeled 15 mer oligonucleotide with three complementary oligonucleotides. The annealed Y-oligomers were purified on a 15% native polyacrylamide gel. Subsequent treatments are the same as in Fig. 3.

효소의 생화학적 특성을 연구할 수 있는 좋은 방법이 된다. 본 연구에서 제작된 3개의 deletion 돌연변이와 2개의 점 돌연변이는 HFV 인테그라제의 단백질 영역의 특성과 효소활성에 직접적으로 관여하는 촉매적 잔기를 밝히고 있다. Deletion 돌연변이 HFVΔC와 HFVΔN의 효소활성 발현 정도를 비교해 볼 때, 포미 바이러스 인테그라제 단백질에서는 C-말단보다는 N-말단이 효소활성 발현에 더 중요함을 알 수 있었다. 또한 점 돌연변이 D164A와 E200A는 각각 혼자서는 3가지의 모든 활성을 다 소실하였으나, deletion에 의하여 효소 활성이 소실된 돌연변이들과의 complementation 반응에서 효소 활성을 보여주어, 이들 점 돌연변이들은 단백질 구조면에서는 온전하나, 촉매적 잔기인 164번 또는 200번의 아미노산 잔기가 돌연변이됨으로 인하여 효소 활성을 상실한 것으로 판단이 되며, 이러한 종합적인 결과는 164번의 aspartic acid와 200번의 glutamic acid는 촉매적 반응에 직접 참여하는 잔기로 작용하고 있음을 보여준다.

레트로바이러스의 인테그라제는 바이러스의 증식을 위하여 반드시 바이러스에게 필요한 효소이다. 따라서, 이 효소의 특성을 정확히 파악하는 것은 인간에게 많이 질병을 일으키고 있는 레

트로바이러스의 증식과 전염을 차단 할 수 있는 중요한 정보를 제공 할 수 있을 것이다.

결 론

1. 인간 포미바이러스 인테그라제의 deletion 돌연변이로서 N-말단 영역, C-말단 영역이 각각 제거된 2개의 돌연변이와 두 영역이 모두 제거된 돌연변이 1개, 중요한 촉매적 잔기가 치환된 2개의 점 돌연변이를 제작하였다.
2. C-말단 영역이 제거된 돌연변이는 인테그라제의 3가지 효소적 활성을 모두 보유 하였으나, N-말단 영역이 제거되거나, 두 영역이 모두 제거된 돌연변이는 효소 활성을 완전히 상실하였다.
3. 포미바이러스 인테그라제의 164번 aspartic acid와 200번 glutamic acid를 각각 alanine으로 치환한 점 돌연변이들은 완전히 효소활성을 상실하여 이들 잔기가 촉매적 잔기로 효소활성에 참여하고 있음을 알 수 있었다.
4. 효소활성이 완전히 상실된 N-말단 제거된 점 돌연변이체와 D164A 또는 E200A와 상호보완적인 반응으로 효소활성을 부분적으로 복구하여 인테그라제의 작용은 이량체 또는 다량체로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Malmquist, W. A., van der Maaten, M. J. and Boothe, A. D. : Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electromicroscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* **29**, 188 (1969).
- 2) 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).
- 3) Hooks, J. J. and Gibbs, C. J. : The foamy viruses. *Bacteriological Reviews* **39**, 169 (1975).
- 4) Flugel, R. M. : Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **4**, 739 (1991).
- 5) 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).
- 6) 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).

- 7) Coffin, J. M. : Replication of retroviridae, In B. N. Fields (ed.) Virology. Raven Press, New York, p1437 (1990).
- 8) Goff, S. P. : Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 527, (1992).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Engelman, A., Mizuuchi, K. and Craigie, R. : HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**, 1211 (1991).
- 12) 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).
- 13) Engelman, A., Bushman, F. D. and Craigie, R. : Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J.* **66**, 3269 (1993).
- 14) van Gent, D., Vink, C., Groeneger, A. M. and Plasterk, R. H. K. : Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains. *EMBO J.* **12**, 3261 (1993).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) Kang, S. Y., Oh, S. A., Lee, H. S., Han, S. T., Seo, J.-W. and Shin, C.-G. : Biochemical characterization of human foamy virus integrase. *Yakhak Hoeji* **48**, 13 (2004).
- 18) Horton, R. M., Ho, S. N., Pullen, J. K., Hunt, H. D., Cai, Z. and Pease, L. R. : Gene splicing by overlap extension. *Methods in Enzymology* **217**, 270 (1993).
- 19) 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).
- 20) Oh, Y.-T. and Shin, C.-G. : Comparison of enzymatic activities of the HIV-1 and HFV integrases to their U5 LTR substrates. *Bio. Mol. Biol. Int.* **47**, 612 (1999).
- 21) Skalka, A. M. : Integrative recombination of retroviral DNA. In Genetic recombination, R. Kucherlapati and R. Smith, eds., Washington, DC, p701 (1988).
- 22) Varmus, H. E. and Brown, P. : Retroviruses. In Mobile DNA, D. Berg and M. Howe, eds. Washington, DC, p53 (1989).
- 23) Appa, R. S., Shin, C.-G., Lee, P. and Chow, S. A. : Role of the nonspecific DNA-binding region and helices within the core domain of retroviral integrase in selecting target DNA sites for integration. *J. Biol. Chem.* **276**, 45848 (2001).
- 24) 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).