Journal of Natural Sciences
Pai Chai University, Korea
Vol. 15, No. 1 : 89-95, 2004

JSRV Env가 세포의 전사 활성에 미치는 영향

김 정 우
배재대학교 자연과학대학 생명공학과

Effects on the transcriptional activity by the JSRV Env

Jung Woo Kim
Bio-Med RRC, Department of Life Sciences, Pai Chai University

폐암을 일으키는 것으로 알려진 JSRV는 NIH3T3 세포를 transformation 시키는 성질이 있다는 것이 알려져 있다. 이 바이러스 중 Envelope 단백질이 NIH3T3를 transformation 시키는 것으로 알려져서 이것이 세포내에서 어떤 전사인자를 활성화시키는지를 luciferase 리포터 플라스미드를 이용한 transient transfection 방법으로 조사하였다. 그 결과 Envelope 단백질은 NF-kB와 AP-1의 활성을 높이는 것으로 밝혀졌다.

JSRV, which causes sheep lung cancer, is known to have the transforming activity of NIH3T3 cells. Especially Envelope protein of this virus has the transforming activity to NIH3T3. To know the effects on the transcriptional activity of transcription factors by this viral protein, transient transfection was performed by using the luciferase reporter system. The result showed that JSRV Envelope protein increased the transcriptional activity of NF-kB and AP-1.

Key Words : JSRV Envelope, Transformation, Luciferase reporter, NF-kB, AP-1

I. 서 론

JSRV(Jaagsiekte sheep retrovirus)는 양의 폐암인 ovine pulmonary carcinoma (OPC) 또는 sheep pulmonary adenomatosis의 원인으로 알려지고 있다(1-4). 이 OPC는 자연에서 발생하는 병으로 폐의 상피세포인 type II pneumocytes 나 Clara 세포를 transformation 시키는 것으로 알려지고 있다(5, 6). 최근에는 이 바이러스의 Env 단백질이 쥐의 NIH3T3 세포를 transformation 시키는 활성이 있다고 알려지게 되었다(7). 이런 효과는 Envelope 단백질이 phosphatidylinositol 3-kinase와 같은 세포내의 여러 가지 단백질과 상호작용하여 세포내 신호전달과정을 통하여 특정한 전사인자의 활성을 변화시킴으로써 나타나는 것으로 알려져 있다(8). 한편, 이 바이러스는 감염시 세포의 리셉터인 hyaluronidase-2 (Hyal-2)와 상호작용하는 것으로 알려졌고, 이 단백질은 그 기능이 아직 알려져 있지 않으나, 흥미롭게도 이 Hyal-2 유전자는 폐암 환자에서 빈번히 deletion 되는 것으로 관찰되는 3p21.3 chromosome 상에 위치하는 것으로 밝혀져, tumor suppressor gene으로 생각되기도 하는 실정이다(9-11). 본 연구에서는 JSRV Envelope 단백질이 NF-kB, AP-1, CREB, NFAT등의 전사인자 활성에 미치는 영향을 조사함으로서 세포의 transforming 효과를 설명하려고 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. Luciferase 리포터 플라스미드: NF-kB, CREB, NFAT 및 AP-1에 의한 리포터의 효과를 증폭시키기 위하여 NF-kB, CREB, NFAT 및 AP-1이 결합하는 DNA의 염기배열을 5에서 10개가 연결되도록 두 개의 상보적 oligonucleotide를 합성하여 5' 말단을 인산화시키고 hybridization한 후 ligation에 의해 여러개가 연결된 DNA 단편을 얻었다. 이것을 Klenow 효소로 blunt로 만든 후 pBlueScript(pBS) 백터에 삽입하여 E.coli에 transformation한 후 생성된 colony들을 miniprep 하여 NF-kB, CREB, NFAT 및 AP-1결합 DNA 부위가 반복된 단편을 획득하고 이것의 염기배열을 조사하여 다시 확인하였다.

얻어진 plasmid를 XbaI 와 BamHI으로 절단한 단편을 enhancer가 없는 pGL2-promoter 백터 (Promega)의 SV40 promoter 위쪽에 NheI과 Bgl II로 절단하여 삽입함으로서 리포터 백터인

pNF-kB-LUC, pCRE-LUC, pNFAT-LUC 및 pAP-1-LUC를 조제하였다.

2. NIH3T3 세포에 transfection : DMEM 배지에서 키우던 NIH3T3 세포를 transfection 하기 하루전날, 새로운 배지에 옮기고 배양하였다. 위에서 만든 백터 DNA들을 Superfect 와 함께 혼합을 시킨 후 그 용액을 세포위에 골고루 분주하고 DMEM 배지상에서 2일간 배양하였다. 2일후, 세포를 용해하고 그 용액을 luciferase 기질과 섞은 후에 곧바로 형광을 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

그림 1 에는 리포터 플라스미드를 나타내었다. 전사 인자인 NF-kB, AP-1, CREB 및 NFAT가 결합하는 conserved DNA 염기배열에 해당하는 sense 및 non-sense olgonucleotide를 합성하여 annealing 시키고 이것이 반복적으로 존재하도록 ligation 시킨 후 이것을 Luciferase 유전자의 promoter 위쪽에 삽입하여 각각의 리포터 플라스미드를 조제하였다. 이들 리포터 플라스미드들은 각각의 전사인자가 활성화되어 이 염기배열을 인식하여 결합하게 되면 전사가 활성화되어 luciferase가 생성되어 이 효소의 기질이 존재하면 효소활성이 나타나서 그 활성을 정량적으로 측정할 수 있도록 조제하였다. 그림 2 에서는 JSRV의 Env 단백질을 항상 발현시키는 세포주(D-GP#c5와 HAc3)를 이용하여 NF-kB, AP-1, NFAT의 전사활성을 조사 결과를 나타내었다. D-GP#c5는 JSRV의 유전자 중 Gag와 Pol 부분을 제거하고 Env 유전자만이 존재하도록 한 플라스미드를 NIH3T3에 transfection 시켜서 transformation 된 세포 주를 얻은 것이고, HAc3는 Env 유전자에 HA tag를 붙여서 anti-HA 항체를 이용하여 단백질 발현을 조사하기 쉽게 하기위한 목적으로 유전자 조작된 플라스미드를 NIH3T3 세포에 transfection 시켜 transformation 된 세포 주를 얻은 것이다. 이들 세포 주들은 항상 Env 단백질을 발현시키는 것으로 알려져 있다. 그 결과 Env 단백질이 NFAT의 활성에는 영향을 미치지 않는 반면, 세포내의 NF-kB와 AP-1의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 그림 3 에서는 NIH3T3 세포에 JSRV Env를 발현시키는 플라스미드와 NF-kB, AP-1, CREB 및 NFAT의 리포터 플라스미드를 co-transfection시키고 2일간 배양 후 luciferase의 활성을 조사한 결과를 나타내었다. Δ-GP는 JSRV Env를 발현시키는 플라스미드이며 transfection 시키는 DNA 양을 똑같이 하기 위하여 pCDNA 플라스미

드를 대조군으로 사용하였다. 그 결과 NIH3T3 세포 내에 JSRV Env 단백질 존재시 NFAT와 CREB의 전사활성에는 아무 효과를 나타내지 않았던 반면, NF-kB와 AP-1에 의해 luciferase의 전사활성이 증가 되는 것으로 나타났다.

Ⅳ. 고 찰

NIH3T3가 JSRV의 Envelope 단백질에 의해 Transformation 되는 것은 한 두가지 효과에 의한 것이 아니라고 여겨지나 본 실험에서는 4가지 전사인자의 활성을 조사하여 그 효과를 설명하려 하였다. NF-kB와 AP-1의 활성이 NFAT나 CREB의 전사 활성에 비해 증가하는 것은 JSRV의 Env 단백질이 이 두 전사 인자의 활성을 증가하는 세포내의 신호전달계를 자극하는 것으로 생각된다. 따라서 이 들 전사활성을 증가시키는 신호전달계에 관여하는 단백질들을 조사함으로써 JSRV Env 단백질이 NIH3T3 세포를 transformation시키는 분자기전을 이해할 수 있으리라 생각된다.

V. 참 고 문 헌

1. Bai, J., R. Y. Zhu, K. Stedman, C. Cousens, J. M. Sharp, and J. C. DeMartini. (1996) J. Virol. 70: 3159-3168.
2. DeMartini, J. C., J. V. Bishop, T. E. Allen, F. A. Jassim, J. M. Sharp, M. de Las Heras, D. R. Voelker, and J. O. Carlson. (2001) J. Virol. 75: 4239-4246.
3. Palmarini, M., C. Cousens, R. G. D미캬디, J. Bai, K. Stedman, J. C. DeMartini, and J. M. Sharp. (1996) J. Virol. 70: 1618-1623.
4. Palmarini, M., J. M. Sharp, M. De Las Heras, and H. Fan. (1999) J. Virol. 73: 6964-6972.
5. DeMartini, J. C., J. V. Bishop, T. E. Allen, F. A. Jassim, J. M. Sharp, M. de Las Heras, D. R. Voelker, and J. O. Carlson. (2001) J. Virol. 75: 4239-4246.
6. Palmarini, M., H. Fan, and J. M. Sharp. (1997) Trends Microbiol. 5: 478-483.

7. Maeda, N., M. Palmarini, C. Murgia, and H. Fan. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4449-4454.

8. Palmarini, M., N. Maeda, C. Murgia, C. De-Fraja, A. Hofacre, and H. Fan (2001) J. Virol. 75: 11002-11009.

9. Rai, S. K., F. M. Duh, V. Vigdorovich, A. Danikovitch-Miagkova, M. I. Lerman, and A. D. Miller. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4443-4448.

10. Lepperdinger, G., B. Strobl, and G. Kreil. (1998) J. Biol. Chem. 273: 22466-22470.

11. Lerman, M. I., and J. D. Minna. (2000) Cancer Res. 60: 6116-6133.

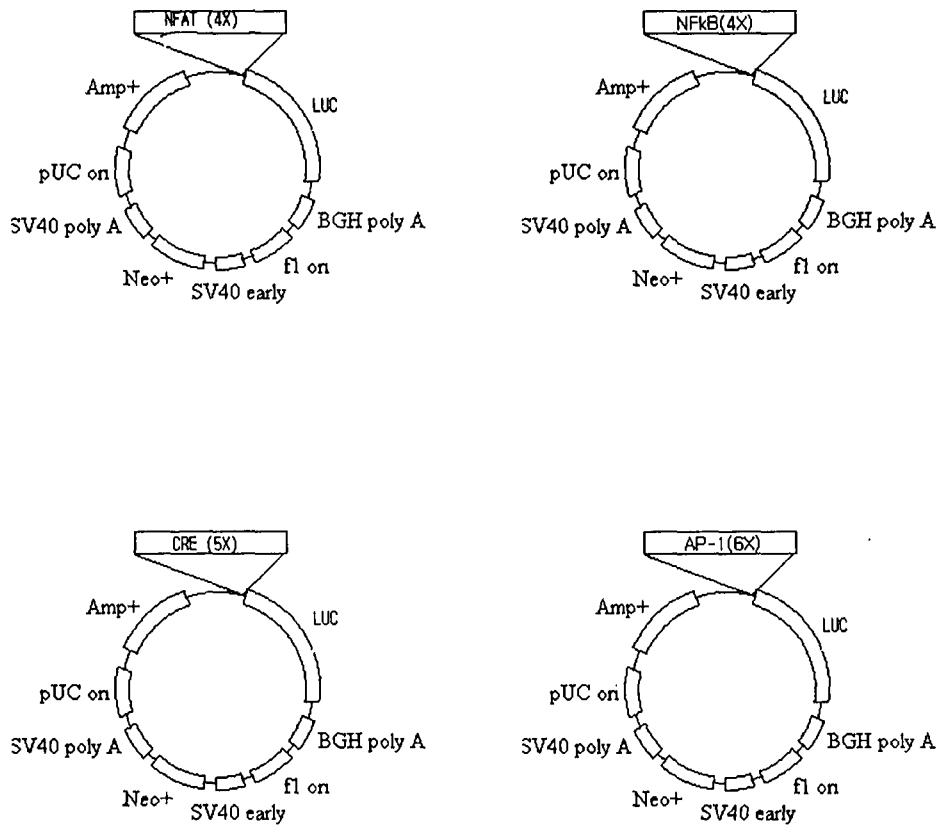

그림1. 리포터 플라스미드의 구조

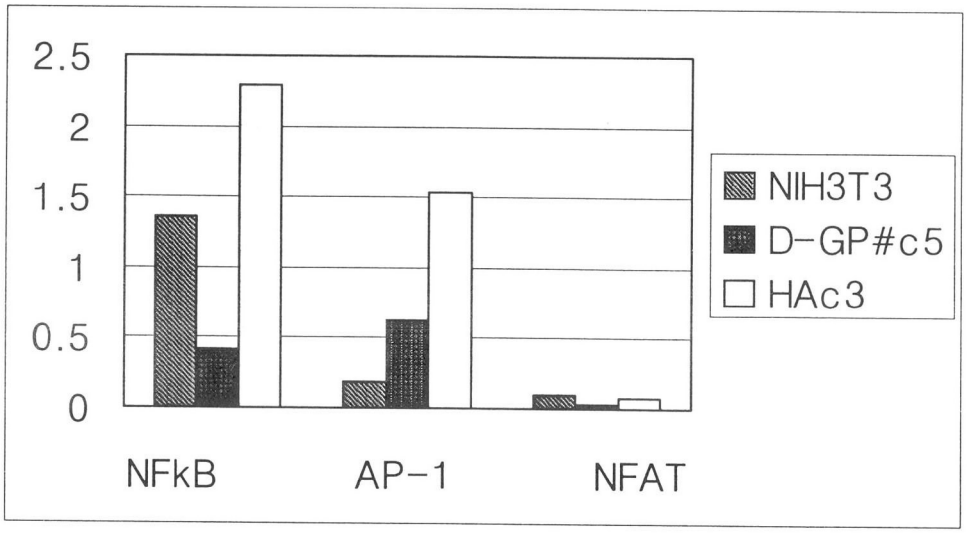

그림 2. JSRV Env 단백질을 항상 발현하는 세포주를 이용한 전사활성 조사

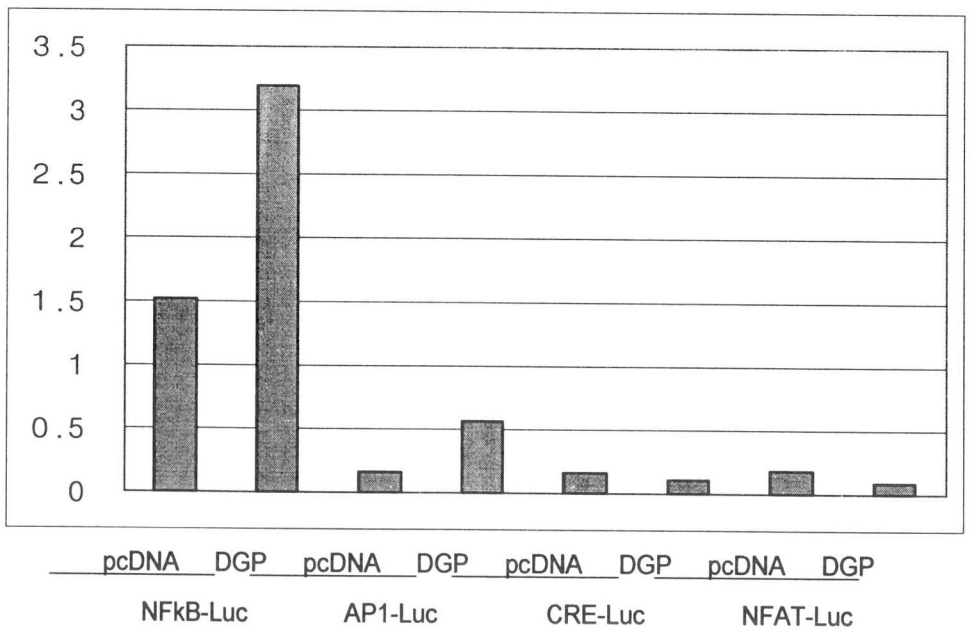

그림 3. Transient Transfection법에 의한 JSRV Env의 전사활성에 미치는 영향