creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Viperin과 Human Cytomegalovirus 단백질 vMIA의 상호작용 Domain의 동정

연세대학교 대학원

의과학과

홍수경

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Viperin과 Human Cytomegalovirus 단백질 vMIA의 상호작용 Domain의 동정

지도교수 서 준 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

홍수경

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

홍수경의 석사 학위논문을 인준함

지도교수 서준영

심사위원장 박채규

심사위원 이재면

연세대학교 대학원

2016년 12월

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

감사의 글

대학원 입학이라는 새로운 시작을 앞에 뒀던 시간이 아직도 생생히 기억이 납니다. 그러나 지금은 대학원 졸업이라는, 다른 시작점이자 끝을 앞두고 있습니다. 감사의 글을 쓰며 저의 대학원 생활을 되돌아보니, 시간이 정말 빨리 갔다는 것이 느껴지면서 제가 그 동안 얼마나 배우고 성장했는지 짚어볼 수 있는 계기가 되었습니다. 저나 부모님에 있어서도 대학원 입학이라는 선택이 쉬운 결정은 아니었음에도 불구하고, 저를 믿어주시고 따뜻하게 지켜봐 주신 부모님께 가장 먼저 감사를 드립니다. 그리고 입학부터 졸업까지 정말 부족했던 저를 잘 지도해주시고 졸업까지 이끌어주신 서준영 교수님, 자문위원으로서 저에게 아낌없는 조언과 평가를 해주신 이재면 교수님, 박채규 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 대학원 생활 동안 저에게 큰 힘이 되어준 입학 동기 선생님들과, 실험실 선생님들 모두에게도 감사의 인사

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

를 드리고 싶습니다. 여러 선생님들 덕분에 대학원 생활을 매우 즐겁게 보낼 수 있었다고 생각합니다. 더불어서, 힘들 때마다 함께 해 준 대학교 동기들에게도 감사의 인사를 전하고 싶습니다.

저자 씀

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

차 례

감사의 글 ····· Ⅳ

차례 ····· Ⅵ

그림 차례 ····· Ⅷ

국문 요약 ····· 1

Ⅰ. 서론 ····· 3

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 10

1. 바이러스와 세포 ····· 10

2. Truncation/Deletion mutants 제작 ····· 10

3. 항체 ····· 11

4. Co-immunoprecipitation ····· 11

5. Western blot ····· 12

6. Immunofluorescence microscopy ····· 13

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

7. Protein-fragment complementation assay ····· 13

III. 결과 ····· 15

1. Viperin과 vMIA 단백질 N-terminal domain의 결합 ····· 15

2. Viperin 과 vMIA 단백질의 상호작용 Domain (아미노산 서열 23-30)검증 ····· 22

3. vMIA 단백질 아미노산 서열 23-30과의 상호작용에 의한 Viperin의 세포 내 위치 변화 검증 ····· 30

IV. 고찰 ····· 35

V. 결론 ····· 44

참고 문헌 ····· 45

영문 요약 ····· 50

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 차례

그림 1. Viperin wild type 과 vMIA mutants의 모식도..... 16

그림 2. Viperin과 vMIA의 상호작용 분석.....17

그림 3. Protein-fragment complementation assay의 모식도..... 24

그림 4. 살아있는 세포 내에서 vMIA 단백질(아미노산 서열 23-30)과 Viperin의 상호작용 검증… 26

그림 5. vMIA mutants 와의 상호작용에 의한 Viperin의 세포 내 위치 변화 분석 32

그림 6. HCMV 감염에 따른 Viperin과 vMIA 단백질의 상호작용 및 작용효과 모델..... 42

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

국문요약

Viperin과 Human Cytomegalovirus 단백질 vMIA의

상호작용 Domain의 동정

Human cytomegalovirus (HCMV)는 β-herpesviridae subfamily에 속하는 바이러스다. 침이나 타액, 체액 등의 접촉을 통해 감염된 HCMV는 신생아, 장기이식 환자, 후천성 면역 결핍 환자 등 면역력이 약하거나 결핍된 사람에게서 치명적인 질환이나 증상을 유발한다. HCMV를 포함한 바이러스 감염에 대한 선천적 면역 반응 중 하나로 인터페론이나 사이토카인의 분비가 일어난다. 인터페론에 의한 반응을 통해 생성, 분비되는 단백질 중 하나인 Viperin은 여러 바이러스에 대응하여 항바이러스 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 HCMV의 단백질 중 하나인 Viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA)와의 결합에 의해 소포체로부터 미토콘드리아로 이동한 Viperin은 Mitochondrial trifunctional protein (TFP)과 상호작용을 하여 지질 합성이나 액틴 세포골격의 붕괴 등 바이러스의 합성에 유리한 상황을 만드는 데 기여한다. 그러므로 HCMV 감염에 따른 세포 내 대사변화는 vMIA와의 상호작용에 의해 Viperin이 미토콘드리아로 이동함으로써 시작된다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 다양한 vMIA mutants 단백질들을 제작하고, Co-

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

immunoprecipitation, Protein-fragment complementation assay, Immunofluorescence microscopy 등의 다양한 기법들을 사용하여 Viperin과 상호작용하는 vMIA의 domain(아미노산 서열 23-30)을 규명하였고, 이 vMIA domain이 Viperin의 미토콘드리아 이동에 필수적임을 검증하였다. 이러한 연구결과는 이들 단백질들의 상호작용을 조절하여 HCMV 감염을 제어할 수 있는 가능성을 제시한다.

핵심 되는 말: Viperin, vMIA, HCMV, 상호작용

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Viperin과 Human Cytomegalovirus 단백질 vMIA의 상호작용 Domain의 동정

<지도교수 **서 준 영**>

연세대학교 대학원 의과학과

홍 수 경

Ⅰ. 서론

Human cytomegalovirus (HCMV)는 β-herpesviridae subfamily에 속하는 Enveloped double stranded DNA (dsDNA)바이러스다.[1] HCMV는 기회주의적 병원균으로, 침이나 타액, 체액 등의 접촉이나 태반을 통해서, 혹은 조직 이식 등의 경로를 통해 감염된다. 정상적인 사람의 경우 10% 정도에서 단핵구증이 발견되나, 대부분은 특이적으로 나타나는 증상이 없다. 그러나 신생아, 장기이식 환자, 후천성 면역 결핍 증후군(AIDS) 환자와 같이 면역력이 약하거나 결핍된 사람에게는 청력 손실, 뇌 발달 손상, 뇌염, 망막염, 장염, 식도염, 폐렴 등과 같은 심각한 증상이나 질병이 나타난다.[2,3]

HCMV의 구조는 가장 바깥에 외피(Envelope)와, 외피 내에 존재

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

하는 바이러스 유전체를 둘러싼 캡시드(Capsid), 외피와 캡시드를 연결하는 피막(Tegument)으로 구성되어 있다.[4,5] HCMV의 캡시드는 Major capsid와 Minor capsid로 구성되어 있는데, 이들 단백질 단위체는 캡시드의 조립과 바이러스의 성숙에 관여한다. 외피는 외피 당단백질 복합체들(Glycoprotein B, gM/gN, gH/gL/gO 복합체)로 구성되며 바이러스의 숙주 세포 침입이나 세포 간의 전파, 바이러스의 성숙에 관여한다. 피막은 수 많은 피막단백질(Tegument protein)들로 구성되며 바이러스의 성숙, 바이러스 DNA의 방출, 바이러스와 숙주 세포의 DNA 전사나 단백질의 번역 조절 등을 매개한다. 바이러스 유전체는 약 230 Kilobase (kb) 정도의 크기를 가지는 dsDNA다.

HCMV는 약 72시간의 주기(Life cycle)를 가지는 바이러스다. HCMV의 감염은 바이러스의 외피와 숙주세포의 세포막이 상호작용하면서 시작된다. 이 상호작용은 바이러스 외피 단백질인 gB, gH 등과 숙주세포의 세포막 수용체를 통해 일어난다. 숙주세포막에 결합한 바이러스는 캡시드를 숙주세포의 세포질로 방출한 후, 이를 미세 소관 등을 이용하여 핵으로 수송한다. 핵막에서 캡시드는 바이러스 유전체를 핵 안으로 방출하여 바이러스 유전체를 복제하고, 복제된 유전체는 바이러스의 여러 단백질의 전사 및 번역에 사용한다. HCMV 캡시드는 핵에서 조립되어 세포질로 방출된다. 방출된 캡시드는 세포질에서 피막단백질들과 결합하여 소포체, 골지체, 바이러스 조합체 (Viral assembly compartment)를 거쳐 최종적으로 외

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

피 단백질에 싸인 성숙한 바이러스 입자의 형태로 세포 밖으로 방출된다.[6)]

바이러스의 감염에 대해, 숙주의 일차적인 면역 반응 중 하나는 인터페론이나 사이토카인의 분비다. 인터페론은 HCMV를 비롯한 DNA, 혹은 RNA 바이러스의 감염, 지질다당체(Lipopolysaccharide, LPS), Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C)등의 다양한 자극에 의해 발현된다. 이들 자극은 세포막 수용체인 Toll-like receptor 2(TLR 2)나 TLR 3 등을 통해 세포 내로 전달되어 Interferon regulatory factor 3(IRF 3)와 IRF 7을 활성화시킨다. 활성화 상태의 IRF는 핵으로 유입되어 인터페론 α나 β의 생성을 촉진한다. 이 과정을 거쳐 발현된 인터페론은 세포 밖으로 방출되어 세포막 수용체인 인터페론 수용체에 결합하고, 이 자극에 의해 Interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF 3)복합체가 형성된다. ISGF3 복합체는 핵으로 유입되어 항바이러스 작용을 하는 Protein kinase R (PKR), GTPase Mx1 (Myxovirus resistance 1), Ribonuclease L (RNase L), ISG 15 (IFN-stimulated protein of 15 kDa), and IFIT (IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats)등의 다양한 Interferon-stimulated gene (ISG)의 발현을 유도한다. Viperin은 이들 ISG 중의 하나로,[7)] I, II, III형 인터페론 외에도 HCMV를 포함한 다양한 DNA 혹은 RNA 바이러스의 감염 등의 자극에 의해서 발현된다.

Viperin은 인터페론-γ를 처리한 대식세포에서 처음으로 동정

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

되었다. Viperin은 사람뿐 아니라 쥐나 원숭이, 어류 등 다양한 종에 걸쳐 발견되는 단백질로, 대부분의 종에서 상당부분이 비슷한 서열로 이루어져 있다.[8] Viperin은 크게 N-terminal, Central, C-terminal domain을 가진다. N-terminal domain은 Viperin의 자가결합체(Self-association)생성, 세포막의 유동성 변화(Curvature), 소포체나 Lipid droplet으로의 이동(Localization)에 관여한다. Central domain에는 Iron-sulfur (Fe-S) binding motif가 있어서 Radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme 기능을 갖는 부분으로, Viperin의 기능에 필수적인 Domain이다. C-terminal domain은 다른 단백질들과의 상호작용이나, 효소반응을 매개하는데 관여한다.[7, 9-11]

Viperin은 다양한 DNA, 혹은 RNA 바이러스 감염에 대응하여 소포체에서 골지체로의 바이러스 단백질의 이동 억제, Lipid droplet에서의 바이러스 복제 억제, 세포막에서 지질체의 유동성을 감소시켜 바이러스의 방출을 억제하는 등의 항바이러스 기능을 가진다. 이 외에도 Plasmacytoid 수지상세포(Dendritic cell)에서 Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK 1)과 TNF receptor associated factor 6 (TRAF 6)을 통한 I형 인터페론 생성의 유도, T 세포 수용체에 의해 매개되는 GATA3의 활성화 기작이나 Helper T 세포 (T cell)의 발달에도 관여하며, 여러 신호 전달 경로에서 조절자로 사용된다.[12,13]

최근 연구에 따르면, Viperin이 바이러스에 유리한 측면으로도

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

작용한다는 결과가 보고되었다. HCMV 감염 초기에 발현된 Viperin은 바이러스 단백질 중 하나인 Viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA)와 상호작용 한다. vMIA는 HCMV 감염 시 숙주세포의 미토콘드리아에서 세포사멸을 억제하는 단백질 중 하나로 알려져 있다.

vMIA는 162개의 아미노산으로 이루어진 단백질이며, 그 크기는 약 35 kDa이다. vMIA는 HCMV의 감염 초기(감염 후 8시간)부터 생성되며, UL37 유전자에서 Alternative splicing 과정에 의해 만들어지는 단백질이다. vMIA는 숙주세포의 Cytochrome C의 방출 억제, 또는 BAX 단백질과의 상호작용을 통해 세포사멸을 억제하며, 이 외에도 HCMV 의 DNA 복제 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.[14] vMIA는 크게 N-terminal domain, Acidic region, C-terminal domain을 가진다. N-terminal domain은 여러 CMV에서 서열이 보존되어 있으며, 크게 MTS (Mitochondrial targeting signal, 아미노산 서열 2-34)α와 β서열로 나뉘어져 있다. 이들 MTS α와 β 서열은 미토콘드리아나 소포체로의 이동을 조절한다. vMIA 아미노산 서열의 중간 부분에 위치한 Acidic region은 HCMV의 DNA 복제에 필수적인 부분으로 알려져 있다. C-terminal domain 또한 N-terminal domain처럼 여러 CMV 에서 유사한 서열을 가지며, 이 Domain과 BAX 단백질의 상호작용에 의해 세포사멸이 억제된다.[15-17,23]

HCMV 감염에 의해 생성된 Viperin은 아직 알려지지 않은 기작을 통해 vMIA와 소포체에서 상호작용하여, 함께 미토콘드리아로 이동

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

한다. 미토콘드리아로 이동한 Viperin은 지방산 산화 (Fatty acid-β-oxidation)에 관여하는 Mitochondrial trifunctional protein (TFP)과의 상호작용을 통해 TFP의 기능을 저해하여 ATP의 생성을 감소시킨다. ATP 생성이 감소함에 따라, 액틴 세포골격의 붕괴와, 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)의 활성화와 이에 따른 Glucose transporter 4 (GLUT 4)발현 증가가 유도된다. 합성된 GLUT 4는 세포 표면으로 이동하여 포도당의 세포 내 유입을 증가시킨다. 이로 인해 세포 내 포도당이 축적되어 해당작용이 증가되고, Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)을 비롯한 전사인자의 활성화가 일어난다. 이 결과로 지방 합성이 증가하며, 증가된 지방은 HCMV 외피를 형성하는 데 사용되어 결과적으로 HCMV의 복제와 방출이 증가한다.[18)]

vMIA의 상호작용에 의한 Viperin의 미토콘드리아로의 이동은 숙주세포의 에너지 및 지방대사 과정의 변화를 일으켜, 바이러스의 생성을 증가시킨다. 그럼에도 불구하고, 두 단백질 간의 상호작용에 관여하는 Domain에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 Viperin과 상호작용하는 vMIA의 Domain을 동정하였다. 이를 동정하기 위해 Co-immunoprecipitation, Fluorescent protein-fragment complementation assay (PCA), Immunofluorescence microscopy 기법을 사용하여, vMIA 단백질의 아미노산 서열 23-30이 Viperin과의 상호작용에 중요함을 확인하였다. 향후 이 Domain에 대한 Mutant protein을 발현하는 재조합 바

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

이러스를 제작하여 HCMV 복제과정에서 Viperin과 vMIA의 상호작용의 역할을 검증함으로써 HCMV 감염 제어 연구에 응용하고자 한다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

II.재료 및 방법

1. 바이러스와 세포

HEK 293T, COS-7 세포를 사용하였다. 세포 배양 시에 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% 의 Penicillin-Streptomycin 항생제를 넣은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 사용하였다. (Thermo Scientific, Waltham, USA) 모든 세포는 37° C, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다.

2. Truncation/Deletion mutants 제작

vMIA에 대한 염기 서열상의 엑손 단위, 혹은 10개~20개의 아미노산 단위 별로 각각 Truncation 또는 Deletion mutants를 제작하였다. 각 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 연쇄효소중합반응(Polymerase chain reaction, PCR) 을 수행한 후, pCDNA3.1 myc,his 벡터에 클로닝 하였다. vMIA wild type (WT)을 비롯한 Mutants의 클로닝에는 5' 말단에 EcoRI, 3' 말단에 HindIII를 선택하였다. Viperin은 5' 말단에 EcoRI, 3' 말단에 BamHI을 선택하였고, Myc tag과 다른 Tag을 발현시키기 위해 Hemagglutinin (HA)-tag 염기서열과 Stop codon을 BamHI과 HindIII 자리에 클로닝하여 Viperin-HA가 발현되도록 제작하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

클로닝한 유전자의 확인은 제한효소를 처리하여 전기영동을 통해 1차적으로 확인 후, Sequencing을 통해 재확인하였다. 또한, Western blot을 이용하여 유전자에서 단백질로의 발현을 검증하였다.

3. 항체

항Viperin 단일클론 항체 (Anti-Viperin monoclonal antibody), 항HA 다중클론 항체 (Anti-HA polyclonal antibody, Santacruz, Santa Cruz, CA 95060 U.S.A.), 항Myc 단일클론 항체 (Anti-Myc monoclonal antibodies, 9E10, 4A6), 항GFP 단일클론 항체 (Anti-GFP monoclonal antibody, Santacruz, Santa Cruz, CA 95060 U.S.A.)를 사용하였다.

4. Co-immunoprecipitation (Co-IP)

60mm Dish (SPL, Seoul, Korea)에 HEK 293T 세포를 배양하였다. Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Massachusetts, USA)을 사용하여 Viperin의 WT과 vMIA Mutants 플라스미드를 Co-transfection 하였다. 세포를 걷어내어 1x Phosphate-buffered saline (PBS) 로 씻어냈다. 2% Polyoxyethylene (20) oleyl ether (Brij98) 와 인산화효소 억제제 및 단백질 분해효소 억제제를 포함하는 1x Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) lysis buffer로 세포를 용해시켰다. 원심분리를 통해 상층액을 분리했다. 상층액에 Normal mouse serum

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

혹은 Normal rabbit serum과 함께 Protein A 또는 G beads (GE healthcare, Little Chalfont, England)로 Pre-clearing을 수행했다. 원심분리를 통해 상층액을 얻어 표적 단백질에 대한 항체를 Protein A 또는 G bead와 함께 넣고 1 시간 동안 함께 처리하여 항체가 단백질 복합체와 결합할 수 있게 했다. Bead는 0.1x Lysis buffer를 사용하여 씻어낸 후, 2x Sample buffer를 사용하여 Bead에 붙은 단백질을 추출했다. 모든 실험 과정들은 4° C 에서 수행했다. 분리한 단백질은 Western blot을 통해 확인하였다.

5. Western blot

준비된 Sample로 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행한 후 Polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane으로 단백질을 옮겼다. Membrane을 5% Skim milk로 상온에서 Blocking하였다. Membrane에 1차 항체를 넣고 4° C에서 16-18 시간 동안 처리하였다. 0.05% PBS-Tween 20 (PBS-T)로 세 번 Washing 후, 2차 항체를 상온에서 1 시간 동안 처리하였다. PBS-T로 세 번 Washing하고, Enhanced chemiluminescence (ECL, thermo scientific, Waltham, USA)을 사용하여 표적 단백질의 발현을 검출하였다. 각 단백질의 발현 정도에 대한 대조군으로 α-tubulin을 사용하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

6. Immunofluorescence microscopy

Glass coverslip 위에서 배양한 COS-7 세포를 4% Paraformaldehyde (PFA)(Sigma Aldrich, Missouri, USA) 로 고정하였다. 세포막을 투과 (Permeabilization) 처리 후 10% Normal goat serum으로 Blocking 하였다. 각 단백질의 N-terminal, 혹은 C-terminal에 융합된 Tag을 표적으로 하는 1차 항체를 상온에서 처리한다. Viperin의 검출에는 항HA 다중클론 항체, vMIA WT을 비롯한 Mutants의 검출에는 항Myc 단일클론 항체 (9E10)를 사용하였다. 0.02% PBS-T로 Washing 후 형광 물질이 결합된 (Fluorophore-conjugated)2차 항체 (Invitrogen, Massachusetts, USA)를 상온에서 처리하였다. PBS-T로 Washing후 Anti-fade 용액을 떨어뜨린 슬라이드 글라스 위에 Coverslip을 올렸다. Confocal microscopy 를 통해 이미지를 분석하였다.

7. Protein-fragment complementation assay (PCA)

PCA assay는 살아있는 세포 내에서 단백질 간의 상호작용 여부를 확인할 수 있는 방법이다. 상호작용 할 것이라 예상되는 단백질을 발현하는 플라스미드의 5’ 말단, 혹은 3’ 말단에 Reporter 단백질의 단편 (효소나 형광 단백질) 유전자를 클로닝하고, 플라스미드를 Co-transfection 하여 배양 후에 형광현미경이나 Fluorescence-activated cell sorter (FACS)등의 장비를 사용하여 형광 신호나 효소 발현 등을 확인하는 방법이다. 만약 융합 단백

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

질들이 상호작용을 할 경우, 잘려진 Reporter 단백질의 물리적인 거리가 서로 가까워짐으로써 3차 구조를 재형성하게 된다. 이 결과로 단백질의 활성이 정상으로 회복되어 형광이나 효소 활성이 나타나게 된다. 본 연구에서 사용한 Reporter 단백질은 Venus 단백질로, Yellow fluorescent protein signal을 발현하는 형광단백질이다. Venus 단백질을 2개의 단편인 V1 (아미노산 서열 1-158)과 V2 (아미노산 서열 159-239)로 나눠, V1은 Viperin과, V2는 vMIA mutants 플라스미드의 3' 말단에 클로닝하였다. 35mm Glass bottom dish (SPL, Seoul, Korea)에 배양한 COS-7 세포에 Lipofectamine2000 (Invitrogen, Massachusetts, USA)을 사용하여 Viperin-V1 플라스미드와 vMIA mutant-V2 플라스미드를 Co-transfection한 후 하루 동안 배양한다. 배양 후 살아있는 세포에서 Confocal microscopy를 통해 세포 내의 단백질들 간의 상호작용을 형광 단백질의 Signal을 통해 확인하였다. 또한, FACS를 통해 두 단백질들의 상호작용을 정량화 하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

III. 결과

1. Viperin과 vMIA 단백질 N-terminal domain의 결합

Viperin과 상호작용하는 vMIA의 Domain을 동정하기 위해서 다양한 Truncation 또는 Deletion mutants 플라스미드를 제작하였다(그림 1). Viperin wild type (WT)의 제작은 5’ 말단에 EcoRI, 3’ 말단에 BamHI 서열을 넣은 프라이머를 사용하였고, vMIA WT과 Mutants는 5’ 말단에 EcoRI, 3’ 말단에 HindIII 서열을 넣은 프라이머를 사용하여 연쇄중합반응(PCR)을 통해 증폭하였다. 증폭된 DNA단편은 pCDNA 3.1 myc,his 벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드를 제작하였다. Viperin은 HA-tag를 발현시키기 위해서 BamHI 과 HindIII 클로닝 자리에 HA 염기서열과 Stop codon을 삽입하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

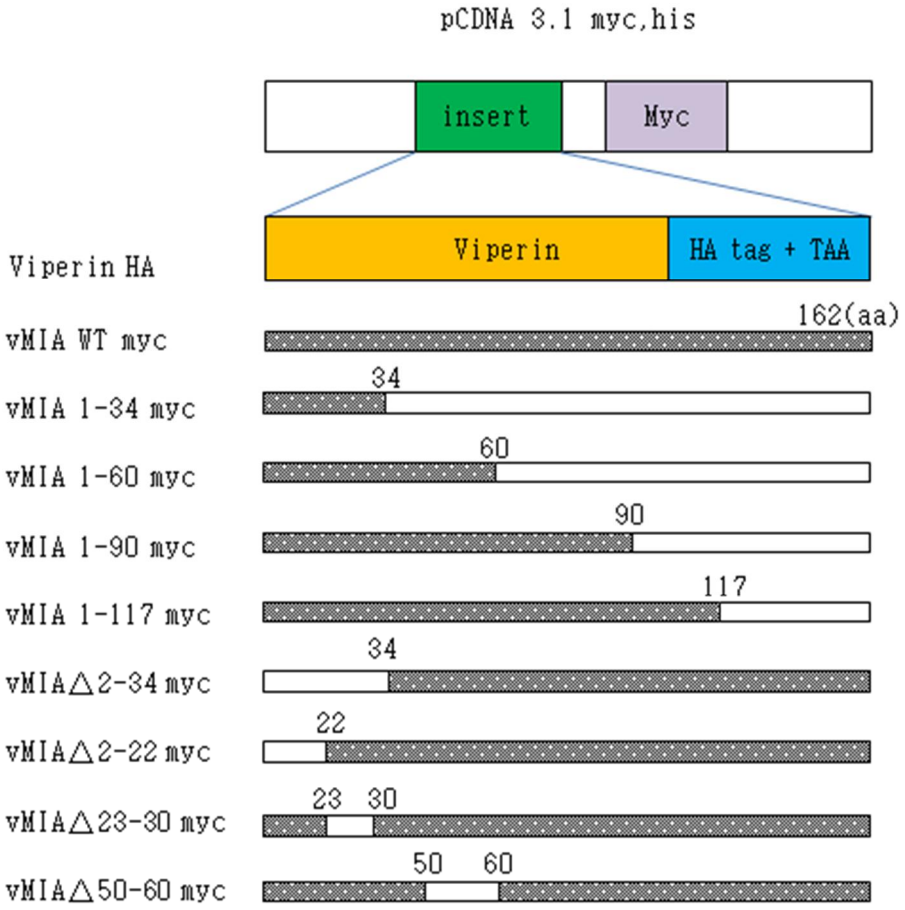
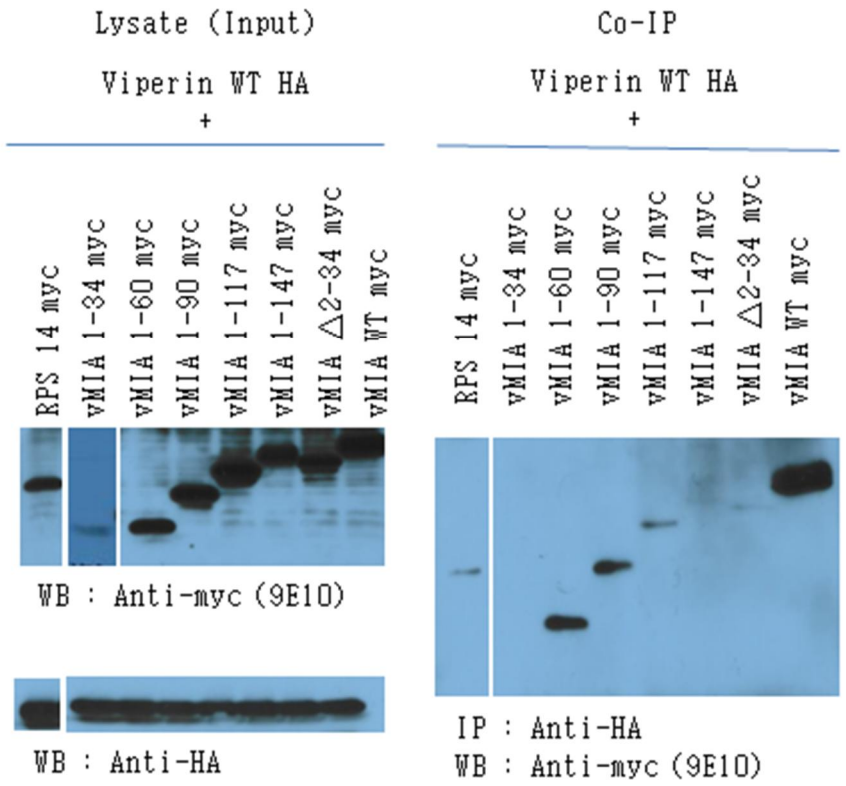


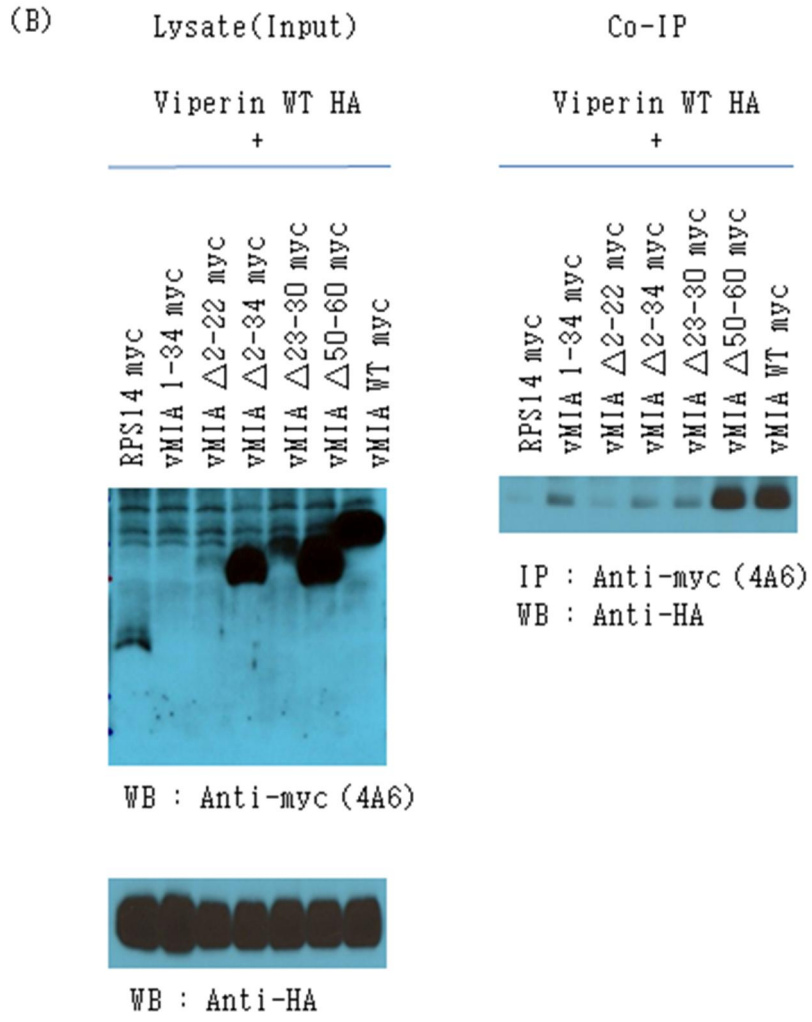
그림1. Viperin wild type 과 vMIA mutants 의 모식도. Viperin과 vMIA mutants 모든 유전자는 pCDNA3.1 myc,his 벡터에 클로닝 하였다. Viperin-HA는 Viperin 을 EcoRI과 BamHI 사이에 삽입하고, HA-stop codon을 BamH과 HindIII 사이에 삽입하여 발현시켰다. vMIA WT과 Mutants는 EcoRI과 HindIII 사이에 삽입하여 vMIA mutants-Myc을 발현시켰다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(A)



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 2. vMIA mutants와 Viperin의 상호작용 분석. (A) Viperin WT과 vMIA truncation mutants (A) 또는 deletion mutants (B)를 Co-transfection 하여 세포를 배양한 후 Co-immunoprecipitation을 수행하였다. 세포 용해 상층액 (Cell lysates)으로부터 각 단백질의 발현도를 HA 또는 Myc tag에 대한 항체를 이용하여 확인하였다. 두 단백질들 간의 상호작용도는 Co-immunoprecipitation 후, 지시된 항체를 사용하여 검출된 단백질의 양으로 비교 분석하였다. Ribosomal protein subunit (RPS)14은 Negative control로 사용하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

제작된 플라스미드를 이용하여 Viperin-HA와 vMIA mutants-Myc의 상호작용을 Co-immunoprecipitation을 수행하여 분석하였다. Viperin과 vMIA truncation mutants를 공동으로 발현시킨 세포에서는 Viperin과 vMIA WT 뿐만 아니라, Viperin과 vMIA 아미노산 서열 1-60을 발현하는 Truncation mutant (vMIA 1-60 myc)도 상호작용하는 것을 관측하였다(그림 2.A). 이 결과로 vMIA 단백질의 N-terminal 부위가 Viperin과 상호작용한다는 것을 확인하였다. 반면 vMIA 아미노산 서열 1-34를 발현하는 Truncation mutant (vMIA 1-34 myc)는 세포 내 발현도가 낮아 Viperin과의 상호작용 여부를 확인할 수 없었다. vMIA 단백질의 N-terminal 부위에서 Viperin과 상호작용하는 Domain을 동정하기 위해서 vMIA deletion mutants를 이용하였다(그림 2.B). vMIA N-terminal의 미토콘드리아 표적 서열 (Mitochondria targeting sequence, MTS, 2-34)은 크게 α와 β 부분으로 나눌 수 있는데, 선행된 연구 결과에서 vMIA α MTS는 vMIA의 미토콘드리아 위치화에 필수적이며, β MTS는 비필수적임이 보고되었다. 이러한 연구 결과를 토대로 α 또는 β 부분이 Deletion된 Mutants를 제작하였다. 제작한 vMIA MTS α deletion mutant (△2-22)는 발현 시 MTS 전체가 Deletion된 Mutants인 vMIA △2-34와 유사하게 미토콘드리아에 위치하지 못하고 세포질 내에 분산되어 분포하는 결과를 확인할 수 있었다. vMIA MTS α 서열 또는 MTS 전체가 Deletion된 Mutants인 vMIA △2-22와 vMIA △2-34 는 Viperin의 상호작용에 대한 Negative controls로 사용하였다. 한편,

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

Viperin과 vMIA 아미노산 서열 50-60 Deletion mutant (vMIA △50-60)와의 상호작용도는 Viperin과 vMIA WT과의 상호작용도와 유사한 것으로 나타났다. 흥미롭게도, Viperin과 vMIA 아미노산 서열 23-30 (MTS β) Deletion mutant (vMIA △23-30)는 상호작용도가 WT간의 상호작용에 비해 급격히 낮아졌음을 확인할 수 있었다. 이 결과들은 Viperin과 vMIA의 상호작용 Domain은 아미노산 서열 23-30이라는 것을 의미한다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

2. Viperin 과 vMIA 단백질의 상호작용 Domain (아미노산 서열 23-30) 검증

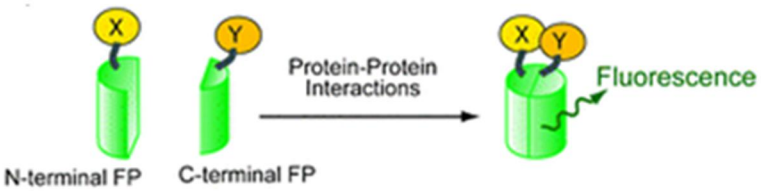
vMIA 아미노산 서열 23-30 이 Viperin과의 상호작용하는 Domain 이라는 것을 검증하기 위해서 살아있는 세포에서 Protein-fragment complementation assay (PCA)를 수행하였다(그림 3-4). PCA는 형광단백질을 두 개의 단편으로 쪼개어 각각의 상호작용 후보 단백질에 결합하여, 이를 살아있는 세포에서 함께 발현 시킨 후 상호작용의 결과를 형광이나 효소 활성으로 확인하는 방법이다. 만약 두 개의 단백질이 상호작용 하는 경우, 융합한 형광단백질 또는 효소의 단편이 아주 가까운 거리에 존재함으로써 단백질의 3차구조를 회복할 수 있고, 이 결과로 형광이나 효소 활성 등의 변화가 나타난다. 이를 통해 두 단백질의 상호작용 여부와 강도를 확인할 수 있다 (그림 3.A). 이 실험에서는 Yellow fluorescence protein의 일종인 Venus 단백질(아미노산 서열 1-239)을 사용하였다. Venus 단백질의 두 개의 단편 (Venus 1, V1 (아미노산 서열 1-158); Venus 2, V2(아미노산 서열 159-239))이 각각 클로닝 된 벡터를 사용하여 Viperin과 vMIA truncation, deletion mutants의 융합 단백질 (Fusion protein)이 발현되도록 제작하였다(그림 3.B). Ribosomal protein subunit (RPS)14는 Negative control로 사용되었고, Leucine zipper는 Positive control로 사용되었다. 재조합 플라스미드를 사용하기 전, 먼저 Western blot을 통해 각 플라스미드에서

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

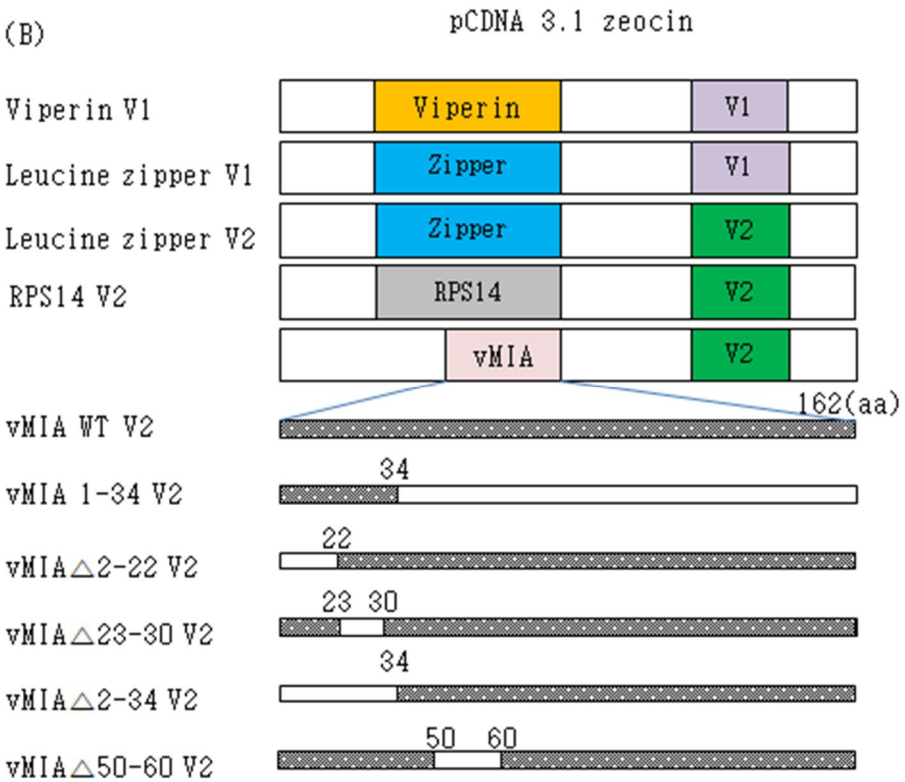
발현하는 단백질의 발현 정도를 확인하였다(그림 4.A). 클로닝한 플라스미드를 Co-transfection 한 후 배양한 살아있는 세포에서의 형광도를 Confocal microscopy (그림 4.B)와 Fluorescence-activated cell sorter (FACS)를 사용하여 관측하였다(그림 4.C). 예상한 대로, Viperin과 vMIA WT이 함께 발현된 세포에서의 형광도는 Viperin과 vMIA △50-60이 함께 발현하는 세포에서의 형광도와 유사하였다. 또한, Viperin과 vMIA 1-34가 함께 발현하는 세포에서도 WT과 유사한 형광도를 확인하였다. 하지만, Viperin과 vMIA △23-30이 함께 발현하는 세포에서는 형광이 거의 관측되지 않았다. 마찬가지로, Viperin과 vMIA △2-34 또는 vMIA △2-22이 함께 발현하는 세포도 형광이 발현되지 않았다. 이러한 결과들은 Co-IP 결과와 일치하며, vMIA 아미노산 서열 23-30이 Viperin과 상호작용하는 Domain임을 재확인 할 수 있었다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(A)



(B)

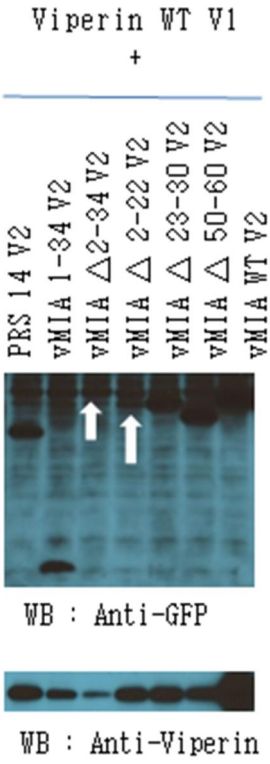


연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 3. Protein-fragment complementation assay의 모식도. (A) GFP, YFP와 같은 형광단백질을 두 개의 단편으로 쪼개어 각각의 상호작용 후보 단백질에 결합하여 발현시킨다. 두 단백질의 상호작용이 일어난다면 형광단백질 단편들의 거리가 가까워져 단백질의 3차 구조가 재형성되고, 이 결과로 세포 내에서 형광이 검출된다. (B) Viperin과 vMIA mutants의 융합 단백질 모식도. Viperin은 V1 단편이 삽입된 벡터에, vMIA WT과 Mutants 단백질은 V2 단편이 삽입된 벡터에서 발현되도록 하였다. 모든 융합 단백질은 벡터 내의 ClaI, NotI 사이에 클로닝하였다. Western blot을 통한 단백질 발현 정도의 확인은 항GFP 단일클론 항체를 사용하였다.

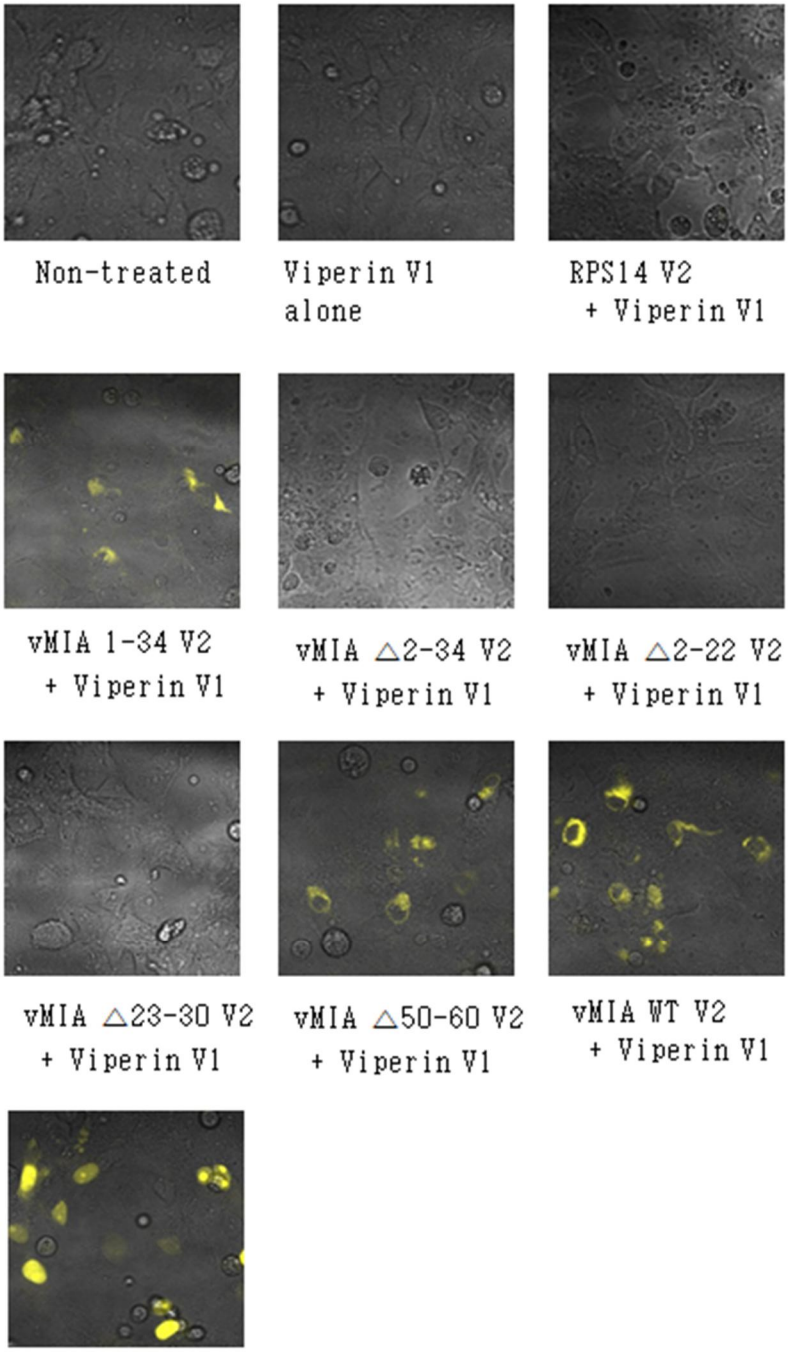
연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(A)

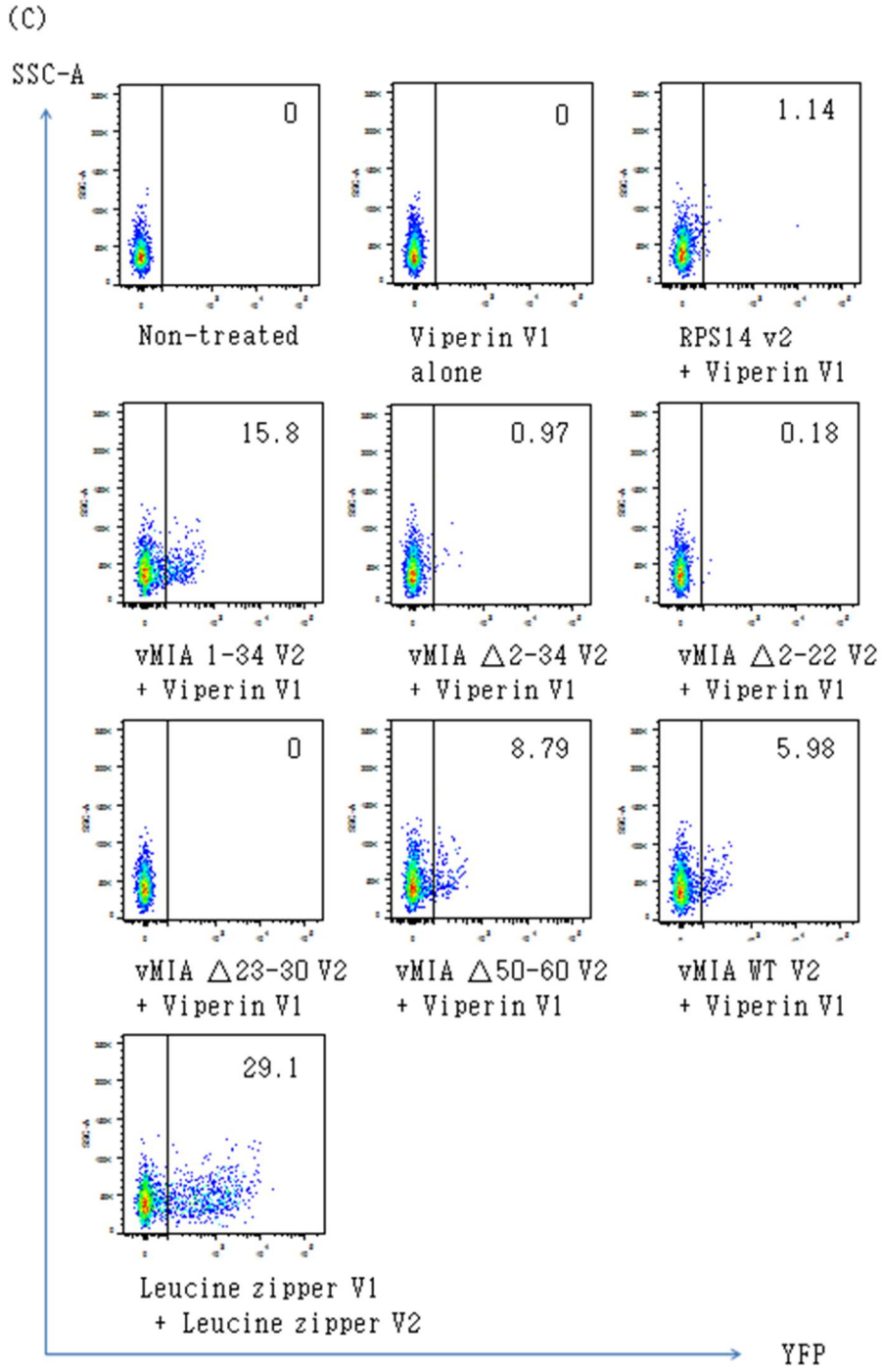


연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(B)



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 4. 살아있는 세포 내에서 vMIA 아미노산 서열 23-30과 Viperin의 상호작용 검증. (A) PCA를 수행하기 전, 단백질의 발현 수준을 지시된 항체를 사용해 확인하였다. (B-C) Glass bottom dish에 COS-7 세포를 배양하여, 지시된 PCA 플라스미드를 Co-transfection 한 후 세포 내의 YFP 형광을 Confocal microscopy (B)와 FACS (C)로 비교 분석한다. Ribosomal protein subunit (RPS)14은 Negative control로, Leucine zipper는 Positive control로 사용하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

3. vMIA 단백질 아미노산 서열 23-30과의 상호작용에 의한 Viperin의 세포 내 위치 변화 검증

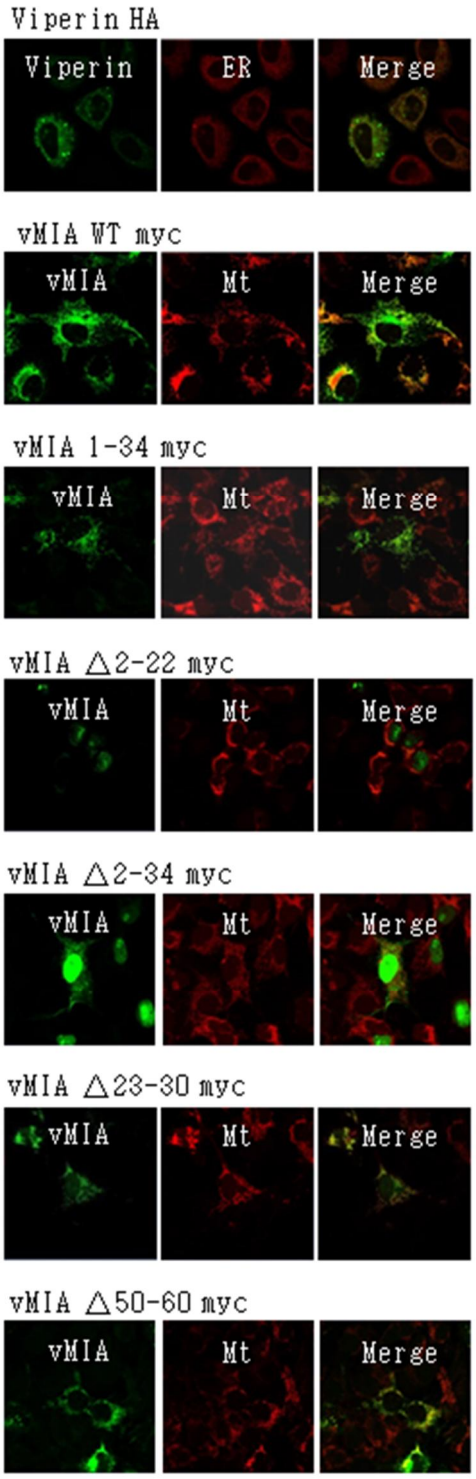
선행된 연구 결과에 의하면, Viperin은 발현 시 세포 내 소포체에 위치하며, vMIA는 미토콘드리아에 위치한다. 그러나 Viperin을 vMIA와 함께 발현시킨 경우에는 Viperin이 vMIA와 함께 미토콘드리아로 이동한다. Co-IP와 PCA 를 통해 vMIA 아미노산 서열 23-30이 Viperin과 상호작용하는 Domain임을 확인하였고, vMIA 단백질 내의 이 Domain이 Viperin과의 상호작용을 통해 Viperin의 세포 내 위치에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해서 Immunofluorescence microscopy를 수행하였다(그림 5). Viperin과 vMIA truncation, deletion mutants를 Single transfection 하여 각 단백질의 세포 내 위치를 관측하였을 때, Viperin은 소포체에, vMIA WT과 MTS α 서열을 포함하는 vMIA mutants, 즉 vMIA 1-34, vMIA △23-30, vMIA △50-60은 미토콘드리아에 주로 분포하고 있음을 확인하였다(그림 5.A). 하지만, MTS α 서열이 없는 vMIA mutants, 즉 vMIA △2-22, vMIA △2-34는 세포 내에 분산되어 분포하고 있었다(그림 5.A). Viperin과 vMIA truncation, deletion mutant를 Co-transfection 하였을 때, Viperin을 vMIA WT이나 vMIA 1-34, vMIA △50-60 mutants와 함께 발현시킨 경우에 Viperin이 vMIA mutants와 미토콘드리아에 함께 위치하는 것을 관측하였다(그림 5.B). 하지만, Viperin과 vMIA △23-30을 함께 발현시킨 세포에서, vMIA △23-30

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

은 미토콘드리아에 위치하나 Viperin은 소포체에 머물러 있는 것을 관측하였다(그림 5.B). 이 결과들은 앞서 수행된 Co-IP와 PCA의 결과들과 일치하며, vMIA 아미노산 23-30과 Viperin의 상호작용이 Viperin의 미토콘드리아로의 이동에 핵심적인 역할을 한다는 것을 의미한다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

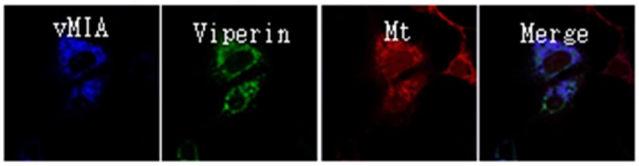
(A)



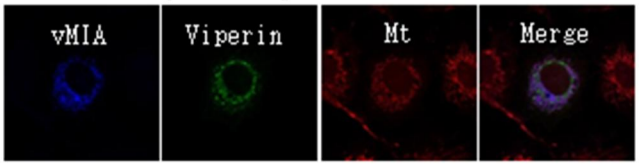
연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(B)

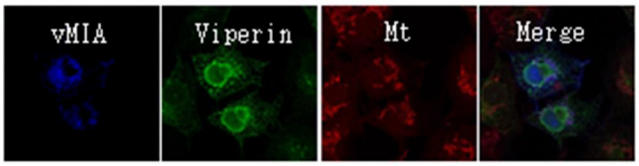
vMIA WT myc + Viperin HA



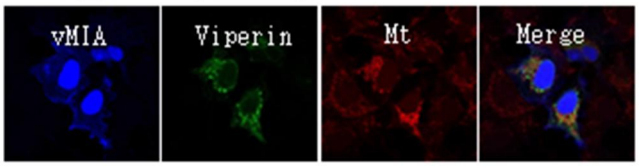
vMIA 1-34 myc + Viperin HAvMIA



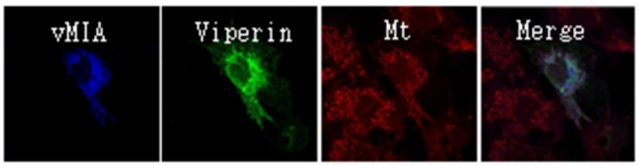
vMIA △2-22 myc + Viperin HA



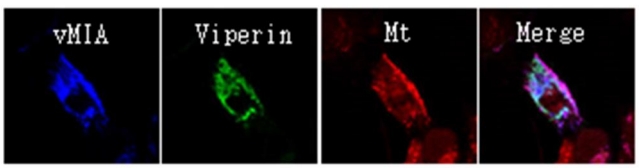
vMIA △2-34 myc + Viperin HA



vMIA △23-30 myc + Viperin HA



vMIA △50-60 myc + Viperin HA



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 5. vMIA mutants와 상호작용에 의한 Viperin의 세포 내 위치변화 분석. (A) COS-7 세포에 지시된 플라스미드를 Single transfection 하였다. Viperin-HA는 항HA 항체를, vMIA-Myc은 항Myc 항체를 사용하였고, 소포체의 표지자로 항Calnexin 항체, 미토콘드리아의 지시자로 Mitotracker를 사용하였다. MTS α서열이 없는 vMIA △2-22, △2-34를 제외한 vMIA 단백질은 모두 미토콘드리아로 이동함을 확인하였으며, Viperin은 Calnexin과의 Co-localization을 통해 소포체에 존재함을 확인하였다. (B) Viperin과 vMIA mutants를 Co-transfection 한 세포를 각 단백질에 특이적인 항체로 염색하여 관찰하였다. Viperin-HA은 항HA 항체, vMIA mutants-Myc은 항Myc 항체 (9E10), 소포체는 항Calnexin 항체, 미토콘드리아는 Mitotracker를 사용하여 염색하였다. MTS β 서열이 없는 vMIA △23-30은 Viperin과의 상호작용에 실패하여, Viperin을 미토콘드리아로 이동시키지 못하였다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

IV. 고찰

Human cytomegalovirus (HCMV)를 비롯한 Herpesvirus 종은 급성 감염뿐만 아니라 만성 감염을 나타내는 바이러스다. 이러한 특성 때문에, 바이러스는 숙주 세포 내에서 숙주의 면역 기작을 회피하는 다양한 기작을 개발하며 진화하게 되었다. 그 예로는 HCMV 바이러스 주(Strain)에 따른 특이적인 항원에 의한 면역 회피 기작, 바이러스 단백질에 의한 숙주의 항체 중화 반응 등으로 숙주의 면역 기작 회피, 이 외에도 숙주의 단백질의 기능을 바이러스에 유리하게 이용하는 기작이 있다.[19] HCMV의 이러한 면역 회피 기작에 대해서는 많은 바이러스 단백질과 숙주의 항바이러스 기능을 나타내는 단백질 차원에서 연구가 진행되어 왔다.

숙주의 항바이러스 단백질 중 하나인 Viperin은 HCMV 단백질인 vMIA와의 상호작용에 의해 미토콘드리아로 이동하여 바이러스 생성에 더 유리한 역할로 작용한다. 이러한 상호작용은 바이러스 생성에 중요한 역할을 하나 아직까지 이들 단백질의 상호작용 기작에 대해선 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 두 단백질 간의 상호작용하는 Domain을 동정함으로써 좀 더 정확한 작용 기작을 밝히는데 정보를 제공하고 바이러스 감염 억제를 위한 연구에 응용 가능성을 제시하고자 했다.

Co-immunoprecipitation은 두 개 이상의 단백질 간의

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

생화학적인 상호작용을 시험관 수준에서 확인할 수 있는 유용한 실험 기법 중 하나다.[20] 비록 항체의 특이성에 따른 결과의 변화나, 큰 단백질 간의 복합체의 검출이 어렵다는 단점을 가지고 있지만 그에 비해 실험 기법이 단순하며, 상호작용하는 단백질들 간의 특이성이 높다는 장점을 가지고 있다.[21] 이러한 특성을 살려, 본 연구에서는 1차적으로 Co-IP 실험 기법을 사용하여 Viperin과 상호작용하는 vMIA의 Domain이 어느 부분인지 선별하였다.

vMIA의 아미노산 서열을 엑손 단위 별로 나눠 제작한 Truncation, Deletion mutants를 이용하여 Viperin WT과의 Co-IP를 수행하였다. 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, 상대적으로 길이가 짧은 vMIA 1-34의 발현 수준은 WT을 비롯한 다른 Mutants 단백질보다 낮은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 vMIA 1-34의 낮은 IP signal은 실제로 상호작용이 일어나는지 아닌지 구분하기가 어려웠다. 아마도 vMIA 1-34의 낮은 발현도는 Unfolding, 혹은 Misfolding된 단백질에 대한 Proteolysis 때문일 수 있어서 MG132와 같은 Proteasome 저해제를 처리하여 vMIA mutants 단백질의 발현 수준을 다시 확인하였다. 그 결과 vMIA 1-34의 발현도가 증가되는 현상을 확인하였으나 vMIA 1-34를 제외한 다른 Mutants에서는 발현이 증가하는 현상을 확인하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 MG132의 처리에 따른 세포의 영향을 배제시키기 위해서 MG132의 처리 없이 실험을 수행하였다. Negative control인 RPS 14과 vMIA △2-34의 결과와 다른 Truncation mutants의 결과를

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

바탕으로, 적어도 vMIA의 N-terminal이 Viperin과의 상호작용에 중요하다는 결과를 얻을 수 있었다.

선행된 연구 결과에 따르면, vMIA의 N-terminal의 MTS 서열은 크게 α와 β 서열로 나뉜다. α와 β서열의 조절에 의해 vMIA는 미토콘드리아, 혹은 소포체로 이동할 수 있다. 이 중 미토콘드리아의 이동에 주된 역할을 하는 부분은 α 서열인 것으로 보고되어 있다. Viperin과 상호작용하는 Domain을 좀 더 정확하게 확인하기 위해, 선행 연구 결과를 토대로 vMIA의 N-terminal을 MTS α와 β서열로 나누어, 이들을 포함한 다양한 Deletion mutants를 제작하여 Co-IP를 수행하였다. 비록 이들 Deletion mutants의 단백질 발현 정도가 WT에 비해 낮았으나 Co-IP 결과를 통해 vMIA 아미노산 서열 23-30이 Viperin과의 상호작용에 핵심적인 Domain인 것을 관측할 수 있었다.

Viperin과 상호작용하는 vMIA domain (아미노산 서열 23-30)에 대한 Co-IP 결과를 검증하기 위해 세포생물학적인 기법인 Protein-fragment complementation assay (PCA)를 수행하였다. PCA는 살아있는 세포 상태에서 두 단백질들 간의 상호작용을 확인할 수 있으므로 상호작용 Domain을 검증하기에 적합한 실험 기법이다. 또한, PCA 는 높은 감도 (High sensitivity)와 더불어 일시적이고, 약한 결합까지도 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있다.[21] Reporter 단백질로 Yellow fluorescent protein signal을 나타내는 Venus YFP 단백질의 단편이 융합된 벡터 DNA를 사용하여 Viperin

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

WT과 vMIA mutants에 각각의 Venus 단편 (V1이나 V2)DNA를 융합하였다. Co-IP 결과에서 일부 단백질의 발현 정도가 다른 단백질보다 낮았던 결과를 확인했기 때문에, PCA를 진행하기 전 클로닝한 DNA에 의한 단백질 발현 정도를 COS-7 세포에서 확인하였다.

Co-IP 에 사용한 플라스미드의 발현 결과와 다르게, vMIA 1-34 V2의 발현 정도가 다른 단백질과 큰 차이가 나지 않음을 확인하였다. 이 결과는 길이가 짧았던 Mutant에 Venus 단편을 융합시킴으로써 단백질 발현이 안정해져 Proteolysis가 일어나지 않았기 때문일 것으로 예상된다. 이 외에도 핵심이 되는 vMIA △23-30 V2의 발현 정도가 WT과 비교해 크게 떨어지지 않는 것을 확인하였기 때문에, 이들 재조합 단백질들을 가지고 PCA를 수행하였다. 그 결과, vMIA의 N-terminal 중 β서열 부분 (아미노산 서열 23-30)이 Viperin과의 상호작용에 매우 중요하다는 결과를 얻을 수 있었다.

두 단백질의 상호작용에 따른 Viperin과 vMIA mutants의 세포 내 분포를 확인하기 위해, Immunofluorescence microscopy를 수행하였다. Viperin, 혹은 vMIA mutants 중 하나만을 Transfection 했을 때, Viperin은 소포체에, α MTS 서열이 없는 vMIA mutants (vMIA △2-22, △2-34)를 제외한 모든 vMIA mutants는 미토콘드리아에 분포함을 확인할 수 있었다. 특히, vMIA의 β MTS 서열을 제거한 Mutant (vMIA △23-30)는 비록

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

발현도는 WT에 비해 낮았으나 세포 내 분포는 WT과 동일하게 미토콘드리아에 위치함을 확인하였다. Viperin과 vMIA mutants를 Co-transfection 한 세포에서 vMIA WT 또는 vMIA의 MTS α 서열을 포함한 Mutants (vMIA 1-34, vMIA △50-60)와 Viperin은 모두 미토콘드리아에 함께 위치하였으나, Viperin과 vMIA △23-30을 Co-transfection 한 세포에서는 vMIA △23-30은 미토콘드리아에, Viperin은 소포체에 각각 존재함을 확인하였다. 이 결과는 Viperin이 vMIA △23-30 과는 상호작용을 할 수 없기 때문에 함께 미토콘드리아로 이동하지 못했음을 의미한다.

연구 결과들을 종합하여, Viperin은 vMIA 의 N-terminal domain, 아미노산 서열 23-30을 통해 vMIA와 상호작용하며, 이 상호작용을 통해 Viperin이 소포체로부터 미토콘드리아로의 이동이 일어난다는 결론을 도출할 수 있었다.

Viperin의 미토콘드리아의 이동은 세포 내 에너지 및 지방대사 변이를 일으키는 시작점이 되며, 이로 인해 HCMV 감염이 촉진된다. 이러한 관점에서, Viperin과 상호작용하는 vMIA domain을 제거하거나 방해하는 경우, 이로 인한 Viperin의 세포 내 분포와, 이 분포가 HCMV 감염에 어떠한 영향을 줄 것인지 고찰해 볼 필요가 있다(그림 6).

첫 번째로, vMIA와 상호작용을 하지 못할 때, HCMV 감염 초기에 Viperin은 미토콘드리아로 이동하지 못하고 소포체에 머물 것이라 생각할 수 있다. 그 결과로 세포 내 에너지 및 지방대사 변화를

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

일으키지 못하여 바이러스 생성이 감소 될 수 있다. 또한, 소포체에 축적된 Viperin의 항바이러스 작용이 더욱 증가하게 될 수 있을 것이다.

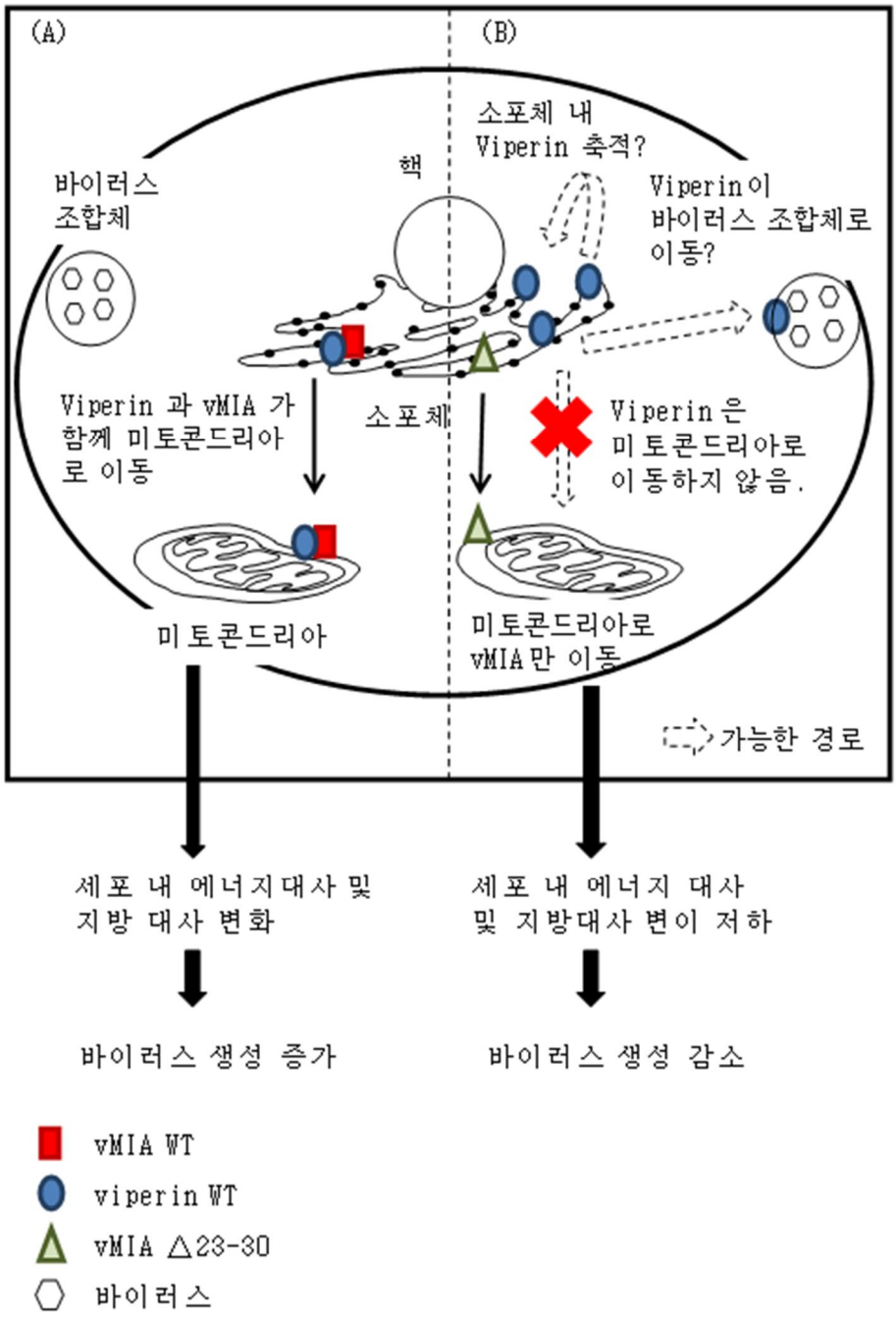
두 번째로, 소포체에 남겨진 Viperin은 HCMV의 다른 단백질들과의 상호작용을 통해서 미토콘드리아로 이동할 가능성도 있다. 하지만, 선행된 연구 결과에서 vMIA가 제거된 HCMV를 감염시킨 세포에서는 감염초기에 Viperin이 소포체에 존재하며 대사변이를 일으키지 않는다는 것이 이미 보고 되었다. 이는 HCMV 감염 시 Viperin이 미토콘드리아로 이동하는 데 있어 vMIA와의 상호작용이 필수적임을 의미한다.[22)]

마지막으로, HCMV 감염 후기에 Viperin은 세포질 내의 바이러스 조합체 (Viral assembly compartment)에서 관측된다.[18)] Viperin이 소포체에서, 혹은 미토콘드리아에서 바이러스 조합체로 이동하는지에 대해서는 이동 경로와 기작이 아직 밝혀지지 않았다. 그러므로, 감염 초기에 미토콘드리아로의 이동을 하지 못해 소포체에 축적된 Viperin은 감염 후기에 HCMV 다른 단백질들과 상호작용하여 바이러스 조합체로 이동될 수 있다. 이 기작은 vMIA mutant를 이용하여 규명할 수 있을 것이라 기대한다. 이러한 가능성들을 검증하기 위해서 vMIA mutants와 Viperin의 Co-transfection시, 세포 내에서의 AMPK의 활성 증감과 지방 생합성의 증감, 그리고 이에 관여하는 여러 효소의 활성 증감 정도를 Q-PCR로 검증하고[22)], vMIA의 아미노산 서열 23-30이 제거된 재조합

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

HCMV를 제작하여 감염시켰을 때 어떠한 효과들이 나타나는지 추가적인 연구가 필요하다. 이 연구 결과들은 향후 HCMV 감염을 제어할 수 있는 효과적인 치료제 개발 등의 연구에 응용될 수 있을 것이라고 전망한다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY



연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

그림 6. HCMV 감염에 따른 Viperin과 vMIA 단백질의 상호작용 및 작용효과 모델. (A) vMIA WT은 Viperin과 상호작용하여 미토콘드리아로 함께 이동한다. 미토콘드리아 내로 이동한 Viperin은 Trifunctional protein과 작용하여 에너지 및 지방 대사를 조절한다. 이로 인해 HCMV 바이러스 복제에 유리한 환경이 조성되어 HCMV 바이러스 생성이 증가하게 된다. (B) Viperin과 상호작용하는 vMIA domain (아미노산 서열 23-30)이 제거된 바이러스는 Viperin를 미토콘드리아로 이동시키지 못한다. 이로 인해 HCMV 감염 초기에 Viperin은 소포체에 축적되고, 세포 내 대사 조절이 일어나지 않게 되어 HCMV 바이러스 생성이 감소하게 된다. 감염 후기에는 Viperin이 HCMV 다른 단백질들과 상호작용하여 바이러스 복합체 (Viral assembly compartment)로 이동할 가능성이 있다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

V. 결론

본 논문에서는 Viperin과 상호작용하는 HCMV 단백질 vMIA의 Domain을 찾기 위해 연구를 진행하였다. 해당 Domain의 동정과 검증을 위해 Co-immunoprecipitation, Protein-fragment complementation assay, Immunofluorescence microscopy를 수행하였다. Co-immunoprecipitation을 통해 vMIA의 아미노산 서열 23-30이 Viperin과의 상호작용에 필요함을 관찰하였으며, Protein-fragment complementation assay를 통해 vMIA의 이 Domain이 Viperin과의 상호작용에 필수적임을 확인하였다. Immunofluorescence microscopy의 결과로, Viperin은 vMIA와의 상호작용을 통해 미토콘드리아로 이동하며, 이 과정에는 vMIA의 아미노산 서열 23-30이 필수적임을 검증하였다. 일련의 실험 과정을 통해, vMIA의 아미노산 서열 23-30이 Viperin과 상호작용하는 Domain이라는 결과를 확인하였다. 이 연구 결과들은 재조합 바이러스의 제작과 더불어 HCMV 감염에 따른 상호작용의 효과를 검증하는 추후 연구의 기반을 제공하고, 향후 바이러스 감염을 제어하는 기술 개발에 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

참고문헌

1. E. Priel, A. Wohl, M. Teperberg, D. Nass, Z.R. Cohen, Human cytomegalovirus viral load in tumor and peripheral blood samples of patients with malignant gliomas, J Clin Neurosci 22 (2015) 326-330.
2. B. Adler, C. Sinzger, Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread?, Thromb Haemost 102 (2009) 1057-1063.
3. C. Steininger, Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system, Clin Microbiol Infect 13 (2007) 953-963.
4. R.F. Kalejta, Tegument proteins of human cytomegalovirus, Microbiol Mol Biol Rev 72 (2008) 249-265, table of contents.
5. S. Landolfo, M. Gariglio, G. Gribaudo, D. Lembo, The human cytomegalovirus, Pharmacol Ther 98 (2003) 269-297.
6. J. Sinclair, P. Sissons, Latency and reactivation of human cytomegalovirus, J Gen Virol 87 (2006) 1763-1779.
7. J.Y. Seo, R. Yaneva, P. Cresswell, Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

regulates virus replication, Cell Host Microbe 10 (2011) 534-539.

8. K.A. Fitzgerald, The interferon inducible gene: Viperin, J Interferon Cytokine Res 31 (2011) 131-135.
9. E.R. Hinson, P. Cresswell, The N-terminal amphipathic alpha-helix of viperin mediates localization to the cytosolic face of the endoplasmic reticulum and inhibits protein secretion, J Biol Chem 284 (2009) 4705-4712.
10. E.R. Hinson, P. Cresswell, The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix, Proc Natl Acad Sci U S A 106 (2009) 20452-20457.
11. A.S. Upadhyay, K. Vonderstein, A. Pichlmair, O. Stehling, K.L. Bennett, G. Dobler, et al., Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity, Cell Microbiol 16 (2014) 834-848.
12. T. Saitoh, T. Satoh, N. Yamamoto, S. Uematsu, O. Takeuchi, T. Kawai, et al., Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

dendritic cells, Immunity 34 (2011) 352-363.

13. L.Q. Qiu, P. Cresswell, K.C. Chin, Viperin is required for optimal Th2 responses and T-cell receptor-mediated activation of NF-kappa B and AP-1, Blood 113 (2009) 3520-3529.

14. V.S. Goldmacher, vMIA, a viral inhibitor of apoptosis targeting mitochondria, Biochimie 84 (2002) 177-185.

15. W.A. Hayajneh, A.M. Colberg-Poley, A. Skaletskaya, L.M. Bartle, M.M. Lesperance, D.G. Contopoulos-Ioannidis, et al., The sequence and antiapoptotic functional domains of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 immediate early protein are conserved in multiple primary strains, Virology 279 (2001) 233-240.

16. J. Ma, F. Edlich, G.A. Bermejo, K.L. Norris, R.J. Youle, N. Tjandra, Structural mechanism of Bax inhibition by cytomegalovirus protein vMIA, Proc Natl Acad Sci U S A 109 (2012) 20901-20906.

17. C.D. Williamson, A.M. Colberg-Poley, Intracellular sorting signals for sequential trafficking of human cytomegalovirus UL37 proteins to the endoplasmic reticulum and mitochondria, J Virol 84 (2010) 6400-6409.

18. J.Y. Seo, R. Yaneva, E.R. Hinson, P. Cresswell, Human

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity, Science 332 (2011) 1093-1097.

19. T.J. Gardner, D. Tortorella, Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway, Microbiol Mol Biol Rev 80 (2016) 663-677.

20. B. Nyfeler, H.P. Hauri, Visualization of protein interactions inside the secretory pathway, Biochem Soc Trans 35 (2007) 970-973.

21. A.G. Ngounou Wetie, I. Sokolowska, A.G. Woods, U. Roy, K. Deinhardt, C.C. Darie, Protein-protein interactions: switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches, Cell Mol Life Sci 71 (2014) 205-228.

22. J.Y. Seo, P. Cresswell, Viperin regulates cellular lipid metabolism during human cytomegalovirus infection, PLoS Pathogen (2013)

23. A.L. Pauleau, N. Larochette, F. Giordanetto, S.R. Scholz, D. Poncet, N. Zamzami, et al., Structure-function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA, Oncogene 26

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

(2007) 7067-7080.

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

<Abstract>

Identification of the Interacting Domains between Viperin and Human Cytomegalovirus-Encoded Protein vMIA

SooKyung Hong

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jun-Young Seo)

Human cytomegalovirus (HCMV) is a member of beta-herpesvirus family. Viperin is a multifunctional interferon-inducible host cellular protein that is directly induced in cells by HCMV infection. This protein has antiviral activity against a variety of RNA and DNA viruses. However, it also has proviral activity through interaction with HCMV viral protein vMIA which predominantly localizes in the mitochondria and has anti-apoptotic function during HCMV infection. Viperin interacts with vMIA and relocalizes from ER to mitochondria. There, viperin interaction with trifunctional protein induces disruption of actin cytoskeleton and modulation of lipogenesis, resulting in enhancement of viral infectivity. Here, we generated a series of truncation and deletion mutants of vMIA

연세대학교
YONSEI UNIVERSITY

to identify its critical domains interacting with viperin, Using co-immunoprecipitation, protein fragment complementation assay and immunofluorescence microscopy, we found that an N-terminal domain (aa 23-30) of vMIA is required for the interaction with viperin. The role of the N-terminal domain of vMIA interacting with viperin in HCMV infection will be further investigated.

Keyword : Viperin, vMIA, HCMV, interaction