

레트로바이러스의 표면단백질: 인슐린의존형 당뇨병의 동물모델인 NOD 쥐의 혈청과 반응하는 새로운 자가항원

아주대학교 의과학연구소 내분비학연구실

김경수 · 김기환 · 김현만 · 윤지원 · 강엽

Retroviral Envelope Protein: A New Autoantigen Reactive with Non Obese Diabetic (NOD) Mice Sera

Kyung-Soo Kim, Ki-Hwan Kim, Hyeon-Man Kim
Ji-Won Yoon and Yup Kang

Laboratory of Endocrinology, Institute for Medical Sciences,
Ajou University, Suwon, Korea

IDDM (Insulin dependent diabetes mellitus) is believed to be an autoimmune disease and characterized by the immune activation against insulin-producing pancreatic beta cell. The identification and characterization of new autoantigens reactive with an activated immune system would help to elucidate the pathogenic mechanism of this disease. Several autoantigens are trying to apply for diagnosis and prevention of IDDM. The NOD (non obese diabetic) mice have been the best model for studying the pathogenesis of human IDDM. To identify new autoantigens reactive with activated humoral immunity of NOD mice, the lambda gt11 cDNA library was constructed from NOD-derived pancreatic beta cell (MIN6N8a: mouse insulinoma cell) and screened with prediabetic NOD sera. Nine positive clones were selected from 2×10^5 phage plaques. The 5'-end sequencing and homology searching showed that six clones from nine clones had over 98% sequence homolgy with the retroviral envelope gene. Full sequencing revealed that the cloned gene was a fragment of ecotropic retrovirus (emv-3) envelope gene. To confirm the immunoreactivity of cloned retroviral envelope protein, the cloned gene fragment was expressed in an *E.coli* expression vector system. Western blotting showed that the recombinant envelope protein fragment also reacted with prediabetic NOD sera. (Ajou Med J 1997; 2(2): 149~158)

Key Words: IDDM, NOD, cDNA cloning, Autoantigen, Retroviral envelope protein

서론

인슐린의존형 당뇨병은 췌장내 베타세포가 파괴되어 인슐린이 절대적으로 부족하여 발병한다¹. 발병기전은 확실하게 밝혀지지 않았지만 유전적으로 감수성이 있는 개인에 있어 외부의 환경인자 즉 식이, 바이러스, 화학물 등에 의한 영향으로 베타세포에 대한 면역체계의

의 항진이 일어나고 이에 따라 베타세포가 점차 파괴되어 발병된다고 믿어진다¹. 특히 환자의 혈청에서 소도 특이 자가항체(islet-specific autoantibody)가 발견되고 췌장 소도에 임파구의 침윤이 나타나는 것으로 보아 인슐린의존형 당뇨병은 베타세포 특이 자가면역 질환(β -cell specific autoimmune disease)으로 생각되어지며, 자연적으로 당뇨병이 발병하는 BioBreeding(BB) 백서와 non obese diabetic (NOD) 쥐를 모델로 한 연구는 인간의 인슐린의존형 당뇨병이 자가면역질환이란 것을 강력히 시사하고 있다².

저자연락처: 강엽, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교 의과학연구소 내분비학연구실, Tel: (0331) 219-4532, Fax: (0331) 219-4537

Bottazzo 등이 췌장의 소도와 반응하는 자가항체가 인슐린의존형 당뇨병 환자에서 존재한다고 보고한 이래 소도 표면 자가항체³, 인슐린 자가항체⁴, 64 kDa 단백질에 대한 항체⁵ 등이 밝혀지고 또한 최근에 Carboxypeptidase H⁶, ICA69⁷, Tyrosine phosphatase⁸에 대한 항체가 존재한다는 것이 밝혀졌다. 특히 64 kDa 단백질은 GAD (Glutamate decarboxylase)로 밝혀졌으며 이 GAD에 대한 항진된 T 임파구가 존재하고 GAD 단백질의 면역으로 NOD 쥐에서 당뇨병을 예방할 수 있음이 보고^{9,10}되어 GAD는 당뇨병 발병에 중요한 자가항원으로 인식되고 있다. 그러나 GAD에 의한 예방이 재현되지 않고 GAD가 베타세포에만 특이하게 존재하지도 않아 GAD에 의한 당뇨병의 발병에 대한 역할에는 논란이 있다. 당뇨병 발병에 대한 자가항원의 역할에 관한 하나의 가설은 어떤 한 시점에서 어떤 이유로 인하여 자가항원이 면역항원으로 작용하여 자가면역체계를 활성화시키고 그에 따라 베타세포 특이 면역체계의 전반적인 활성화를 유발하여 베타세포의 파괴를 가져올 수 있다는 것이다¹¹. 그러므로 당뇨병의 발병에는 한가지 특정 항원보다는 많은 자가항원이 관련되어 있을 것으로 추측된다. 또 다른 가설은 베타세포에 존재하는 자가항원에 의해 면역반응이 항진된다고보다, 외부에서 유입된 항원(virus 등)이나 알 수 없는 이유로 활성화된 면역체계가 베타세포를 특이하게 인식하여 결국 베타세포를 공격할 수 있다는 것이다¹². 인슐린의존형 당뇨병의 발병에 자가항원의 역할이 어떠한지 활성화된 면역체계와 반응하는 베타세포 특이 자가항원을 규명하고 이 항원의 역할을 조사하면 인슐린의존형 당뇨병의 병인학적 기작을 규명하는데 크게 기여할 수 있다고 생각된다. 또한 인슐린의존형 당뇨병은 발병 전에 베타세포에 대한 항진된 면역반응이 존재하는데 발병 초기 자가항원의 규명과 그에 따른 면역체계의 조사는 인슐린의존형 당뇨병의 조기진단에도 적용할 수 있고 당뇨병 발병에 관련된 자가항원이 규명된다면 이 항원을 통한 면역관용(self tolerance)을 유발시키는 연구를 통해 인슐린의존형 당뇨병 예방에도 이용할 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 NOD 쥐를 인슐린의존형 당뇨병 모델로 하여 새로운 자가항원의 규명을 시도하였다. NOD 쥐의 베타세포 유래 MIN6N8a(mouse insulinoma) 세포의 cDNA library를 만들고 당뇨병이 발병하기 전(prediabetic stage) NOD 쥐의 혈청을 가지고 자가항체와 반응하는 자가항원을 검색하였다. NOD 쥐의 항체와 반응하는 양성 자가항원 클론을 골랐으며 이 클론이 무슨 유전자인지 알기 위하여 각 클론의 염기서열을 조사하고 Genbank[®]에 등록된 유전자 database를 기반으로 하여 유전자의 상동성을 조사하였다. 클로닝된 유전

자의 재조합 단백질이 면역혈청과 반응하는지 확인하기 위해 이 유전자를 대장균을 이용하여 발현시키고 정제하여 Western blotting으로 면역 반응성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포 및 동물

유전자 서고(gene library)를 만들기 위한 베타세포로 MIN6N8a 세포를 사용하였다¹³. 이 세포는 SV40 T 항원으로 베타세포를 형질전환한 Balb/C 쥐를 NOD 쥐와 교배하여 NOD 쥐의 유전적 형질로 바꾼 후 분리한 세포로 고혈당에서 인슐린을 분비하는 베타세포의 성질을 가지고 있다. 이 세포는 Dr Miyazaki 교수(University of Tokyo, Japan)로부터 분양 받았다. 당뇨병 질환 동물인 NOD 쥐는 캐나다의 University of Alberta에서 분양 받아 유한양행 중앙연구소 동물실에서 사육중인 10~12 주령의 우성 NOD 쥐를 사용하였다. 이 NOD 쥐의 당뇨병 발병률은 30 주령까지 약 40~50%이고 소도염증은 10~12 주령에서 100%이다.

2. MIN cDNA 서고 구성

MIN6N8a 세포는 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 저당(1g/L 포도당) DMEM(Dubellco's minimal essential medium)에서 배양하였다. 약 60~70% monolayer를 이룬 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척 후 PolyA Tract mRNA isolation kit(Promega Biotech, WI)를 이용하여 MIN6N8a mRNA를 분리하였다. cDNA 클로닝은 방향성을 가진 cDNA 클로닝 방법을 이용하였다¹⁴. NotI-dT 프라이머를 이용하여 cDNA를 만들고 EcoRI adaptor를 양쪽 말단에 붙인 후 NotI으로 절단하여 EcoRI 부위와 NotI 부위를 가진 cDNA를 같은 제한효소 부위를 가진 λgt11 벡터에 끼워 넣었다. λgt11-MIN6N8a cDNA를 *in vitro* packaging kit(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 대장균(*E. coli* Y1090)에 transfection 시켰다¹⁵.

3. 면역검색

약 10,000 개의 phage plaque를 형성할 λgt11-MIN6N8a cDNA packaging액을 대장균(*E. coli* Y1090)에 감염시키고 45°C, 0.7% LB(Luria broth) 아가로즈 용액에 섞은 후 LB agar plate에 부었다¹⁶. 3~4시간 배양하여 phage lawn을 형성하고 IPTG(isopropyl thio-galactopyranoside)로 미리 적

신 NC(nitrocellulose) 필터를 phage lawn 위에 올렸다. 3~4시간 더 배양하고 이 필터를 말린 후 5% 탈지 분유 PBS 용액에서 blocking시켰다. 1차 항체는 10~12 주령 된 10마리의 NOD 쥐의 혈청을 100배 희석하여 사용하고, 2차 항체는 Alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG 항체를 사용하였다. 염색은 BCIP(bromo chloro indoyl phosphate)/NBT(nitrobluetetrazolium)로 하였고 강하게 염색된 클론을 양성 클론으로 선택하였다. 20개의 plate를 조사하였으므로 전체적으로 약 2×10^5 개의 phage plaque를 검색하였다.

4. 염기서열 결정

양성 클론의 5'-말단의 염기서열을 분석하기 위하여 OmniBase cyclic sequencing(Promega Biotech, WI) 방법을 이용하였다. 양성 클론의 파지를 PEG(polyethylene glycol) 법으로 침전시키고 파지 DNA를 phenol/chloroform 법으로 추출하고 ethanol 법으로 침전시켰다¹⁷. λ gt11의 forward primer를 sequencing primer로 하고 신호를 증폭시키기 위해 kination 방법을 이용하여 프라이머를 32 P로 labelling하였다. OmniBase sequencing enzyme를 이용하여 30회 cyclic 반응(95°C, 2 minutes as denaturation, then 95°C, 30 seconds and 70°C, 30 second as denaturation, annealing and extension, respectively)하였다. 합성된 DNA는 8% urea-PAGE(polyacryl amide gel electrophoresis)에서 분획한 후 autoradiography 하여 염기서열을 읽었다. 유전자의 전체 염기서열을 결정하기 위해 이미 결정된 염기서열 정보로부터 oligonucleotide를 합성하여 다시 cyclic sequencing을 수행하여 나머지 부분의 염기서열도 결정하였다. 염기서열을 결정한 후 이 유전자가 무슨 유전자인지 알기 위해 Genbank®의 DNA database를 기반으로 하여 cutoff value 45와 Ktup value 4에서 homology searching을 수행하였다(DNASIS, Hitachi).

5. 발현 및 정제

양성 클론의 유전자의 면역 반응성을 조사하기 위해 클론한 유전자를 대장균에서 다량 발현시키고 정제하여 Western blotting 방법으로 면역 반응성을 조사하였다. 양성 클론 파지를 대량 배양한 후 파지 DNA를 추출하고 EcoRI과 NotI로 절단한 후 절단된 조각 DNA를 pET30b 벡터(Novagen, WI)의 같은 제한효소 부위에 subcloning 하였다. 대장균 *E.coli* BL21(DE3)를 형질전환시키고 IPTG로 유도발현 하였다¹⁸. 발현은 10% SDS-PAGE 후 Coomassie blue로 염색하여 확인하였다. 발현이 끝난 대장균을 inclusion body 정제법으로 침전물만

정제 후 6M urea에서 용해시키고 His Bind resin column(Novagen, WI)을 이용한 affinity chromatography를 수행하여 정제하였다¹⁹.

6. Western blotting

단백질을 10% PAGE에서 분획하고 전기영동된 단백질을 Nitrocellulose(NC) membrane에 옮겼다. NC membrane을 건조시킨 후 5% 탈지분유에서 단백질이 옮겨지지 않은 부위를 blocking 시켰다. PBS로 100배 희석된 prediabetic NOD 혈청을 1차 항체로 하고 PBS로 2,000배 희석한 Alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG 항체(Sigma)를 2차 항체로 하여 3~5시간 반응시켰다. 이 때 각 단계별로 PBS로 3~4회 세척하였다. 마지막으로 염기성 완충액으로 세척한 후 BCIP/NBT로 발색시켰다²⁰.

결 과

1. 면역검색

먼저 prediabetic NOD 혈청의 항체반응성을 조사하기 위해 MIN6N8a 단백질의 Western blotting을 수행하였다. Fig. 1에서 보듯이 prediabetic NOD 혈청과 acute diabetic NOD 혈청에는 음성 대조군 쥐인 ICR 쥐의 혈청과 비교하여 몇 개의 더 뚜렷한 밴드를 볼 수 있었다. 또한 밴드의 강도도 전반적으로 더욱 강하게 나타났다. prediabetic NOD 혈청과 acute diabetic NOD 혈청에는 같은 크기의 항원(분자량: 14, 16, 30, 60, 80 kDa)을 인식하는 항체도 존재하였으나 몇 가지 항원은(35, 40, 70, 90 kDa) prediabetic NOD 혈청과 acute diabetic NOD 혈청에 특이하게 반응하기도 하였다.

NOD 혈청과 반응하는 자가항원을 찾기 위해 MIN6N8a의 cDNA 서고를 prediabetic NOD 혈청을 이용하여 검색하였다. prediabetic NOD 혈청을 이용하여 MIN6N8a cDNA 클론을 검색하였을 때 염색 강도가 강한 15개의 클론을 얻을 수 있었으며 2차 검색 결과 9개의 클론만이 양성 클론으로 판명됐다. 순수한 클론으로 분리하기 위해 다시 3차 클로닝을 수행하였으며 Fig. 2은 3차 검색 결과를 보여준다. 9개의 양성 클론은 cDNA가 끼워 들어가지 않은 음성 대조(-) 클론보다 염색 강도가 강했으며 클론 3-5가 가장 염색 강도가 크고 강한 것으로 판명되었다.

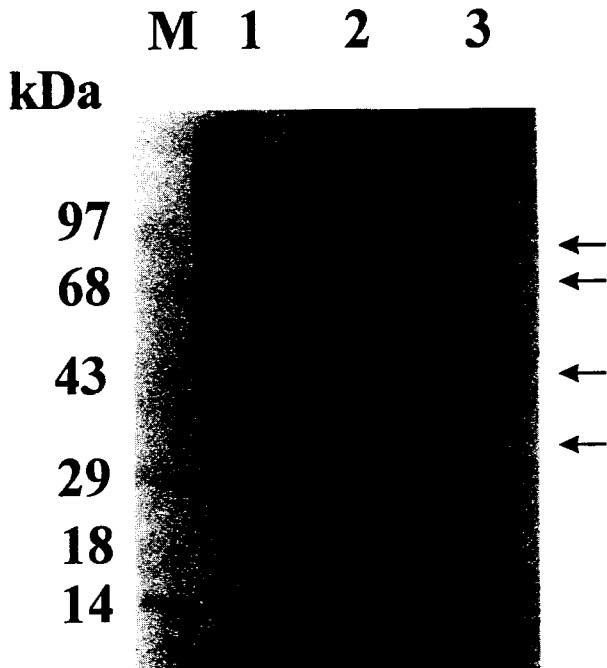


Fig. 1. Western blotting of MIN6N8a protein with NOD sera. The whole protein was prepared by direct solubilization of MIN6N8a cell with SDS-PAGE loading buffer. About 100 μ g of proteins were fractionated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking the membrane with 5% skim milk, the immunoreactive proteins were detected by binding with 100 fold diluted mice(ICR; lane 1, prediabetic NOD; lane 2, acute diabetic NOD; lane 3) sera and alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG antibody as primary and secondary antibody, respectively, and then by developing with BCIP/NBT.

2. 염기서열분석

양성 클론의 5'-말단의 약 200개의 염기서열을 분석하고 Genbank[®]의 database에서 homology searching하였다. 9개의 클론 중 6개의 클론(2-1, 3-1, 3-2, 3-3, 8-1, 10-1)이 레트로바이러스의 표면 단백질인 envelope 단백질 유전자와 98% 이상 상동성이 있는 것으로 판명되었다(Table 1). 클론 3-2의 모든 염기서열을 결정하고 레트로바이러스 유전자와 비교한 결과 envelope 유전자에서 약 99%, 3'-말단 비번역 부위에서도 95%의 상동성을 가지고 있어 본 연구에서 얻은 양성 클론은 레트로바이러스의 envelope 유전자의 일부로 생각된다. 이 레트로바이러스는 쥐의 endogenous ecotropic murine leukemia virus(emv-3)의 염기서열을 가지고 있으며 그 외, 유전자 database 에서 gene homology searching 결과 6개의 등록된 유전자 정보와 일치한다(Table 2). Fig. 3은 3-2 클론의 cDNA 전체 염기서열을 보여주고 있으며 발현된

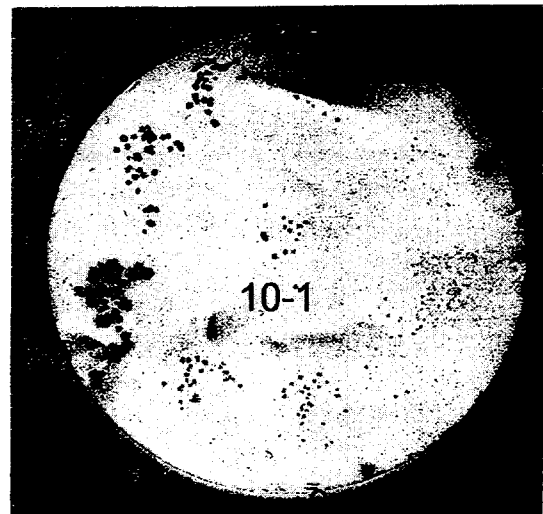


Fig. 2. Third screening of λ gt 11 MIN6N8a cDNA library with diluted prediabetic NOD sera pool. Phage lawn was made by infecting *E.coli* Y1090 with *in vitro* packaged phage and pouring onto LB agar plate. Cloned genes were expressed by chemical induction and the expressed proteins were transferred by overlaying IPTG-saturated NC membrane on phage lawn. The positive signal was detected by binding with prediabetic NOD sera and alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG antibody, and by developing with BCIP/NBT. This picture depicts the third screening of selected phage clones.

open reading frame과 그에 따른 아미노산 서열을 보여 준다. 3-2 클론의 경우 envelope 유전자에 있어 등록된 M21028 레트로바이러스 envelope 유전자와 오직 한 개의 point mutation(C-T 497th nucleotide)이 존재하고 이로 인해 Threonine이 Isoleucine (166th amino acid)으로 바뀌었다.

3. 클론 3-2 cDNA의 발현 및 정제

레트로바이러스 표면단백질이 NOD 쥐의 혈청과 반응하는지 확인하기 위해 3-2 클론으로부터 cDNA를 분리하고 다시 대장균 발현 벡터인 pET30b에 끼워 넣었다. 이 벡터는 T7 프로모터를 이용하는 벡터이므로 T7 RNA polymerase가 lysogenic 상태로 있는 대장균 BL21 (DE3)를 형질전환 시켰으며 envelope 조각 단백질을 IPTG로 유도발현 시켰다. 발현된 단백질의 크기는 약 27 kDa(Fig. 4)이었으며 발현과 정제를 위한 N-말단 융합체(S-tag-His)의 분자량을 제외하면 약 21 kDa 정도이고 이 크기는 3-2 클론의 cDNA의 open reading frame의 크기(174 amino acid)와 거의 일치한다. 비록 발현률은 적으나(약 2~3%) 발현된 단백질은 수용액에서 용해되

1	GGGACTACCGCCCTAGTGGCCACTCAGCAGTTCCAACAACCTCCAGGCTGCCATGCACGAT	60
1	G T T A L V A T Q Q F Q Q L Q A A M H D	20
61	GACCTTAAAGAAGTTGAAAAGTCCATCACTAATCTAGAAAAATCTTTGACCTCCTTGTC	120
21	D L K E V E K S I T N L E K S L T S L S	40
121	GAAGTAGTGTTACAGAATCGTAGAGGCCTAGATCTACTATTCCTAAAAGAGGGAGGTTTG	180
41	E V V L Q N R R G L D L L F L K E G G L	60
181	TGTGCTGCCTTAAAGAAGAATGCTGTTTCTATGCCGACCACACAGGATTGGTACGGGAT	240
61	C A A L K E E C C F Y A D H T G L V R D	80
241	AGCATGGCCAAACTTAGAGAAAGATTGAGTCAGAGACAAAAGCTCTTTGAATCCCAACAA	300
81	S M A K L R E R L S Q R Q K L F E S Q Q	100
301	GGGTGGTTTGAAGGGCTGTTTAATAAGTCCCCTTGGTTCACCACCCTGATATCCACCATC	360
101	G W F E G L F N K S P W F T T L I S T I	120
361	ATGGGTCCCTGATAATCCTCTTGTTAATTTTACTCTTTGGGCCTTGATTCTCAATCGC	420
121	M G P L I I L L L I L L F G P C I L N R	140
421	CTGGTCCAGTTTATCAAAGACAGGATTTCCGGTAGTGCAGGCCCTGGTTCTGACTCAACAA	480
141	L V Q F I K D R I S V V Q A L V L T Q Q	160
481	TATCATCAACTTAAGATAAATAGAAGATTGTAATCACGTGAATAAAAGATTTTATTCAGT	540
161	Y H Q L K ^(C) • I I E D C K S R E *	175
541	TTACAGAAAGAGGGGGGAATGAAAGACCCCTTCATAAGGCTTAGCCAGCTAACTGCAGTA	600
175		175
601	ACGCATTTTGAAGGCATGGGAAAATACCAGAGCTGATGTTCTCAGAAAAACAAGAACAA	660
175		175
661	GGAAGTACAGAGAGGCTGGAAAGTACCGGGACTAGGGCAAACAGGATATCTGTGGTCAAG	720
175		175
721	CACTAGGGCCCCGGCCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGAAATAGCTAAAACAACAA	780
175		175
781	CAGTTTCAAGAGACCCAGAAACTGTCTCAAGGTTCCCCAGATGACCGGGGATCGGCCCA	840
175		175
841	AGCCTCATTTAAACTAACCAATCAGCTCGCTTCTCGCTTCTGTACCCGCGCTTATTGCTG	900
175		175
901	CCCAGCTCTATAAAAAGGGTAAGAACCCACACTCGGCGGCCAGTCCTTCGATAGACTG	960
175		175
961	AGTCGCCCCGGTACCCGTGTATCCAATAAAGCCTTTTGCTGTTGCATCCGAAAAAAAAA	1020
175		175

Fig. 3. Nucleotide and amino acid sequence of 3-2 clone.

Nucleotide sequence was determined by cyclic DNA sequencing method with synthetic oligonucleotide primers. The amino acid sequence was deduced from determined nucleotide sequence. Only one nucleotide(C) of mouse endogenous retroviral envelope gene was changed to T at 497th nucleotide. The mutated location was indicated as •.

지 않는 것으로 보아 inclusion body 상태로 발현되는 것으로 생각된다. pET 벡터는 6개의 Histidine를 융합체로 발현시키는 발현 시스템을 가지고 있으므로 Ni-sepharose를 이용한 affinity chromatography를 수행하여 정제하였다. 더욱 순수하게 정제하기 위해 SDS-PAGE에서 분획된 단백질을 electroelution 하여 알코올 침전시켰다. Fig. 5는 순수하게 정제된 재조합 3-2 클론 레트로 바이러스 envelope 조각 융합단백질을 보여준다.

4. 면역반응

정제된 단백질을 다시 10% SDS-PAGE 에서 분리하고 NC membrane에 옮긴 후 prediabetic NOD 혈청으로

Table 1. Homology matching of cloned new genes with reported genes listed on Genebank database

Clone	Size of Insert(kb)	Matched Gene	Homology(%/size)
2-1	1.1	Env ^a	98/181
3-1	1.0	Env	98/169
3-2	1.2	Env	98/188
3-3	0.9	Env	99/226
3-5	1.8	New ^b	
8-1	1.0	Env	98/224
9-1	1.2	New ^{b,c}	
9-2	1.0	New ^{b,c}	
10-1	1.1	Env	99/255

Around 200 nucleotide sequence of each positive clone was determined and compared with reported genes on Genebank database.

Env^a Ecotropic retroviral envelope gene(Env-3)

New^b: Unreported new gene

New^c: Clone 9-1 and 9-2 are the same gene although each clone has different size

Western blotting을 수행하였다. Fig. 6에서 보듯이 prediabetic NOD 혈청은 본 실험에서 발현 정제한 레트로 바이러스 표면 단백질 일부와 뚜렷하게 반응하는 것을 알 수 있었다.

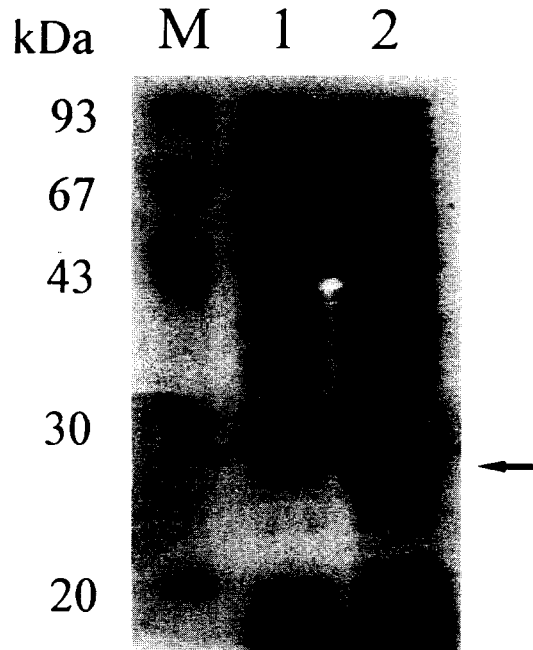


Fig. 4. Expression of 3-2 clone gene in E.coli. The cDNA from clone 3-2 phage was subcloned into pET30b to construct expression vector pET30b-3-2. E.coli BL21(DE3) was transformed with this recombinant vector. After IPTG induction, the whole proteins were extracted with SDS-PAGE loading buffer. Around 100µg of protein was fractionated on 10% SDS-PAGE. Protein bands were stained with Coomassie blue. Lane 1 and lane 2 denote the protein bands of uninduced E.coli as a control and induced E.coli with pET30b-3-2, respectively. M denotes the molecular weight standard.

Table 2. List of genes having homology with clone 3-2

No.	Name	Accession No.	Homology (%/size ^a)
1	Mouse endogenous murine leukemia proviral env region DNA	M21028	99.8/525
2	Mouse mRNA for mouse melanoma antigen	D10049	99.6/525
3	Mouse(strain C3H) endogenous C3H/He murine leukemia proviral pol and env region DNA	M19005	99.6/525
4	M.musculus env mRNA from SV-40 transformed cells	X62670	99.4/525
5	Mouse endogenous ecotropic murine leukemia proviral locus 3(Env-3) envelope glycoprotein(env) gene	L37057	99.4/525
6	Mouse endogenous MuLV ecotropic loci putative pol genes, gag and env genes	M87550	98.8/512
7	Mouse endogenous ecotropic proviral gene, env gene region	M11751	100.0/154

size^a: size of homology with envelope region of clone 3-2

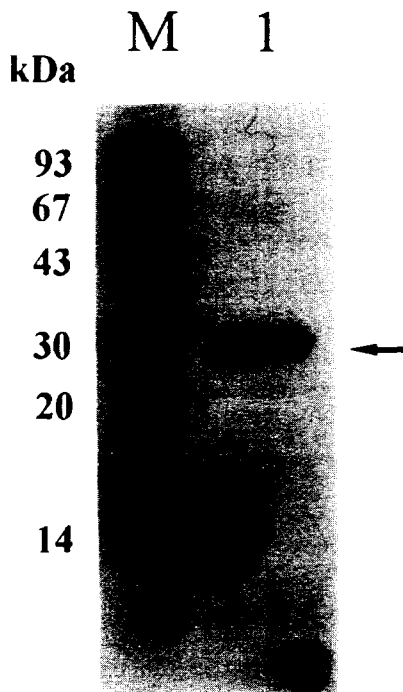


Fig. 5. SDS-PAGE of the purified 3-2 protein. The expressed 3-2 protein was purified by His Bind chromatography. The 3-2 protein was eluted from acryl amide gel strip after being fractionated on SDS-PAGE. The eluted 3-2 protein(arrow in lane 1) was detected on SDS-PAGE.

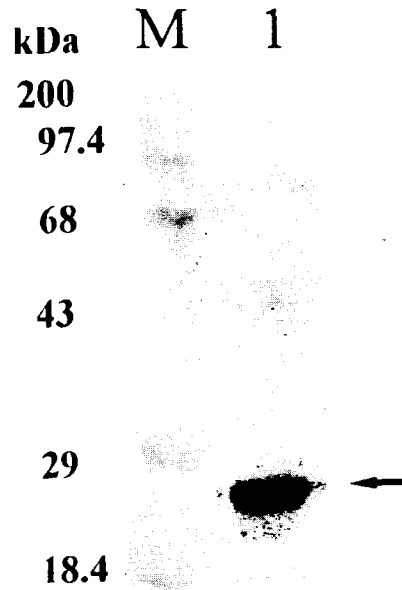


Fig. 6. Western blotting of the purified 3-2 protein with prediabetic NOD sera. The purified recombinant 3-2 protein was fractionated on 10% SDS-PAGE and transferred to NC membrane. The immunoreactivity was also checked by Western blotting(Materials and methods). The immunoreactive band is depicted by arrow(in lane 1).

고 찰

NOD 쥐의 항진된 면역 체계와 반응하는 베타세포 특이 자가항원을 찾고 규명하기 위해 NOD 유래 베타세포주인 MIN6N8a 세포의 cDNA 서고를 만들고 당뇨병이 발병하는 NOD 쥐의 당뇨병 발병 전 혈청과 반응하는 클론을 검색하였다. 약 2×10^5 개의 파지 클론을 검색한 결과 9 개의 양성 클론을 찾았다. 이 클론들의 염기서열을 밝히고 Genbank®에 등록된 유전자들과 상동성을 조사한 결과 6개의 클론이 레트로바이러스의 표면단백질인 envelope 유전자의 일부로 밝혀졌다^{21,22,23}. 반면 나머지 3개의 클론은 아직 보고되지 않은 유전자로 밝혀졌다. 또한 레트로바이러스 envelope 단백질이 NOD 쥐의 혈청과 반응하는지 조사하기 위해 우리가 클론한 envelope 유전자의 일부를 대장균에서 발현시키고 이 단백질을 분리한 후 NOD 쥐의 혈청과 다시 반응시켰다. 이 결과 NOD 쥐의 항진된 면역체계는 레트로바이러스의 envelope 단백질과 반응하는 것으로 밝혀졌다.

인슐린, GAD, IA-2 등은 이미 보고된 자가항원이지만

만 우리의 양성 클론 중에는 포함되지 않았다. 실제 GAD와 인슐린은 NOD 쥐의 체액성 면역 체계와 약하게 반응하거나 또는 거의 반응하는 않는 것으로 알려져 있다²⁴. 그러므로 본 연구에서 사용된 NOD 혈청과 반응하여 선별될 확률은 극히 미약하여 선별되지 않았을 가능성이 있다. 레트로바이러스 envelope 항원을 가진 클론들은 NOD 혈청과 반응하지만 3-5 클론보다는 약하게 반응하는 것으로 나타났으므로 NOD 쥐의 체액성 면역이 레트로바이러스 envelope 단백질에는 강력하지 않은 것 같다. 이는 체액성 면역이 약하면 세포성 면역이 강하다는 이전의 보고를 고려할 때 레트로바이러스 단백질의 세포성 면역이 더욱 강할 수 있을 가능성이 있다¹⁰. 본 실험에서 얻은 양성 클론 중 대부분의 클론이 레트로바이러스 envelope 항원 클론으로 나타났는데 이는 본 실험에 사용된 cDNA 서고의 원천이 MIN6N8a 세포에서 레트로바이러스 유전자의 고발현이 있을 수 있음을 시사한다. 특히 SV40 T항원으로 유발한 종양세포의 경우 endogenous retrovirus의 발현이 증가하였다고 보고되었는데 이는 실험에 사용된 MIN6N8a 세포의 경

우도 SV40 T 항원으로 유발한 종양세포이므로 레트로 바이러스 유전자가 과발현 되었을 가능성도 있다²⁵.

인슐린의존형 당뇨병의 발병에는 유전적 요인 외에 환경적 요인이 중요한데 오래 전부터 환경적 요인의 하나인 바이러스의 감염이 인슐린의존형 당뇨병의 발병에 시발점이 될 수 있다고 생각되어져 왔다¹². 특히 Coxsackie 바이러스를 비롯한 Picorna 바이러스가 직접 베타세포를 감염시키거나 베타세포 특이 자가면역반응을 항진시켜 인슐린의존형 당뇨병을 유발할 수 있다고 보고되었다. 반면 레트로바이러스도 NOD 쥐에서 인슐린 의존형 당뇨병의 발병에 어떤 관련성이 있다고 보고되었는데, 내부 레트로바이러스(endogenous retrovirus)의 발현이 NOD 쥐에서 특이하게 발현되고 있음이 전자현미경으로 관찰되었고²⁶, Gaskins 등은 xenotropic 레트로바이러스가 NOD 쥐의 베타세포에서만 발현됨을 보고하여 레트로바이러스의 발현과 NOD 쥐의 당뇨병의 발병과의 관련성을 보고했다²⁷. 또한 Nakagawa 등은 NOD쥐에서 레트로바이러스의 단백질인 gag 단백질이 NOD 쥐의 소도에 발현되고 있음을 보고하여 레트로바이러스의 항진된 자가면역성이 인슐린의존형 당뇨병의 발병에 어떤 역할을 할 수 있을 것임을 시사했다²⁸. 그러나 위의 모든 보고는 뚜렷한 종의 레트로바이러스나 클론된 레트로바이러스 유전자를 사용한 연구가 아니므로 인슐린의존형 당뇨병의 발병의 직접적인 관련성을 연구하는데 한계를 지니고 있다. 그러나 본 연구에서는 직접 endogenous ecotropic leukemia 바이러스의 envelope 유전자를 NOD 유래 베타세포에서 클로닝하였으므로 레트로바이러스의 역할을 좀 더 명확히 연구할 수 있을 것으로 기대된다.

특히 레트로바이러스 단백질이 항진된 NOD쥐의 체액성 면역 체계와 직접 반응한다는 것은 내부 레트로 바이러스의 갑작스런 발현으로 인하여 면역체계가 이 바이러스 단백질을 외부 물질로 인식하고 이 바이러스에 대한 항진된 면역 반응으로 인하여 베타세포가 파괴될 가능성이 있음을 의미한다. 더군다나 몇 가지 레트로바이러스 및 관련 물질이 췌장 소도에서만 관찰되고 발현되었다는 보고는 베타세포 특이 면역반응에 레트로바이러스가 어떤 역할을 담당할 수 있다고 추론할 수 있다. 예비 실험 결과 NOD 쥐의 췌장에서 클로닝된 레트로바이러스 유전자가 관찰되고 췌장 소도 염증이 일어나는 시기와 레트로바이러스 envelope 유전자의 발현이 증가되는 시기가 일치하는 결과를 관찰하였는데 이는 췌장 소도염 진행에 레트로바이러스의 역할을 더욱 중요시 여길 수 있는 근거가 될 수 있을 것이다.

레트로바이러스가 인슐린의존형 당뇨병의 발병에 관여할 수 있다는 또 다른 기작은 레트로바이러스 단백

질이 superantigen으로 작용할 수 있다는 것이다. 최근 연구에서 인체 인슐린의존형 당뇨병 환자에서 분리한 인체 내부 레트로바이러스(human endogenous virus)의 envelope 단백질이 superantigen으로 작용하여 Vβ7 subset T림파구를 활성화시킬 수 있음을 보고하였다²⁹. 이는 레트로바이러스의 envelope 단백질이 superantigen으로 작용하여 어떤 특정한 subset의 T 림파구를 항진시키고 이 항진된 T 림파구가 베타세포의 파괴에 연관될 수 있음을 시사한다. NOD 쥐에 있어 소도염이 발생하는 초기에 항진된 T 림파구의 subset이 제한되어 있다는 보고가 있는데^{30,31} 이는 NOD 쥐에서도 superantigen의 역할이 있을 수도 있음을 시사하고 있다. 이와는 반대로 레트로바이러스의 발현이 면역 억제 효과를 유발할 가능성도 있다. 많은 레트로바이러스의 감염은 면역 억제 효과를 유발하고 특히 envelope 단백질 중 일부 펩타이드가 면역 억제 효과 내지 T_{H2} 형 T 림파구를 활성화시킬 수 있다고 보고되었는데 흥미로운 것은 이 실험에서 클로닝된 envelope 단백질에 있어서도 면역 억제 효과를 유발하는 펩타이드의 서열과 완전히 일치하는 서열이 존재하고 있어 본 연구에서 얻은 envelope 단백질의 면역 억제 효과도 연구할 필요가 있을 것이다. 이는 소도염의 발생 중 만들어진 사이토카인이 레트로바이러스의 envelope 단백질의 발현을 증가시키고 이로 인한 면역 억제 효과가 베타세포의 파괴를 지연시킬 수 있다는 새로운 가설을 추론할 수 있게 한다. 실제 췌장 소도염이 발생하고도 오랜 기간 유지하고 세포성 면역을 억제하는 T_{H2}형의 사이토카인이 동시에 존재한다는 보고는 면역 억제 기작이 작동할 것으로 추측되는데³² 이 면역억제 기작이 레트로바이러스의 발현에 의한 것인지 연구가 필요할 것이다.

결 론

인슐린의존형 당뇨병은 자가면역 질환으로 믿어지며 인슐린을 생산하는 베타세포에 대한 항진된 면역반응이 존재한다. 이 항진된 면역체계와 반응하는 자가항원의 규명은 당뇨병 병인 연구뿐만 아니라 진단 예방에 까지 적용될 수 있다. 이에 본 연구팀은 인슐린의존형 당뇨병의 동물모델인 NOD 쥐에서 자가항원을 클로닝하고 규명하기 위해 NOD 쥐의 베타세포 유래 세포주인 MIN6N8a 유전자를 가지고 있는 λgt11 발현 서고를 만들었다. 양성 클론은 NOD 쥐의 혈청을 이용하여 검색하였는데 2×10⁵ 파지로부터 9개의 클론을 찾았다. 그 중 6개의 클론이 쥐의 내부 레트로바이러스 표면단백질의 일부 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌다. 레트로바

이러스 표면단백질의 면역 활성을 조사하기 위해 본 연구에서 클론한 레트로바이러스 표면단백질의 일부를 대장균을 이용하여 발현하였고 이 단백질은 NOD 혈청과 반응함이 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 '96 연도 보건 의료기술훈양사업의 지원에 의하여 이루어진 것이므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Yoon JW, Kang Y, Kim HM, Lee KW, Chung YS, Lee M and Jun HS: Cellular and molecular pathogenic mechanism of Type I diabetes. *Ajou Medical Journal* 2: 13-39, 1997
2. Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Mol Endocrinol* 15: 516-542, 1994
3. Bottazzo G, Florin-Christensen A and Doniach D: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine deficiency. *Lancet* 2: 1279-1283, 1974
4. Palmer J, Asplin CM, Clemons P, Lyon K, Tatpat O, Raughu P and Paquette TL: Insulin antibodies in insulin dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 222: 1337-1339, 1983
5. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, and Lernmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell protein. *Nature* 298: 10252-10256, 1988
6. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA and Eisenbarth GS: Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Met* 73: 1197-1201, 1991
7. Martin JM, Trink B, Daneman D, Dosch HM and Robinson BH: Milk proteins in the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 23: 447-452, 1991
8. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hick JM, Goldstein DE and Rae PM: Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatase. *J Immunol* 152: 3183-3188, 1994
9. Kaufman D, Clare-sarzier M, Tian J, Forthuber T, Ting G, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ and Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366: 72-75, 1993
10. Tisch R, Yang X, Singer S, Liblau R, Fugger L and McDevitt H: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlate with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366: 72-75, 1993
11. Yang Y, Charton B, Shimata A, Dal-Canto R and Fathman CG: Monoclonal T cells identified in early NOD islet infiltrate. *Immunity* 4: 189-194, 1996
12. Yoon JW: Viral pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. In *autoimmunity and the pathogenesis of diabetes*(ed. Ginsberg F and McEvoy RC) New York, Springer, 1990. pp206-255
13. Sakuma N, Ishikawa S, Okada K, Myazaki J and Saito T: Glucose induces calcium independent insulin secretion from the pancreatic beta cell line MIN6. *Euro J Endocrinol* 133(2): 227-234, 1995
14. Grimaldi G, Manfioletti G and Schneider C: A lambda vector from directional cDNA cloning and in vitro transcription. *Nucl Acid Res* 15(22): 9608, 1987
15. Rosenberg SM: Improved in vitro packaging of lambda DNA. *Meths Enzymol* 153: 95-103, 1987
16. Mierendorf RC Percy C and Young RA: Gene isolation by screening lambda gt 11 library with antibodies. *Meths Enzymol* 152: 458-469, 1987
17. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular cloning*. 2nd ed, Cold spring harbor Press, 1989, pp2.60-2.81
18. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ and Dubendorff JW: Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Meths Enzymol* 185: 60-88, 1991
19. Van-Dyke MW, Sirita M and Sawadog M: Single step purification of bacterially expressed polypeptide containing an oligo-histidine domain. *Gene* 111(1): 99-104, 1992
20. Harlow Ed and Lane D: *Antibodies*. Cold spring harbor laboratory Press, 1988, pp471-510
21. Sithandam G and Rapp UR: A single point mutation in the envelope gene is responsible for replication and XC fusion deficiency of the endogenous ecotropic C3H/He murine leukemia virus and for its repair in culture. *J Virol* 62: 932-943, 1988
22. Hayashi H, Matsubara H, Yokota T, Kuwabara I, Kanno M, Koseki H, Isono K, Asano T and Taniguchi M: Molecular cloning and characterization of the gene encoding mouse melanoma antigen by cDNA library transfection. *J Immunol* 149: 1223-1229, 1992
23. Timmons PM, Brickell PM, Latchman DS and Rigby PW: Activation of endogenous retroviral transcription in SV40-transformed mouse cells. *Nuc Acid Res* 19(25): 7215-7218, 1991
24. Roep BO: T-cell responses to autoantigens in IDDM. *Diabetes* 45: 1147-1156, 1996
25. Feuchter AE and Mager DL: SV40 large T antigen transactivates the long terminal repeats of a large family of human endogenous retrovirus-like sequences. *Virology* 187: 242-250, 1992
26. Suenaga K and Yoon JW: Association of beta-cell-specific expression of endogenous retrovirus with development of insulinitis and diabetes in NOD mouse. *Diabetes* 37: 1722-1726, 1988
27. Gaskins HR, Prochaza M, Hamaguchi K, Serreze Dv and

- Leiter EH: Beta cell expression of endogenous xenotropic retrovirus distinguishes diabetes-susceptible NOD/Lt from resistant NON/Lt mice. *J Clin Invest* 90: 2220-2227, 1994
28. Nakagawa C, Hanafusa J, Yutsudo H, Nakajima K, Yamamoto N, Kono N, Hakura A and Tarui S: Retrovirus gag protein p30 in the islets non-obese diabetic mice: relevance for pathogenesis of diabetes. *Diabetologia* 35: 614-618, 1992
29. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J and Arcari R: A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in Type I diabetes. *Cell* 90: 303-313, 1997
30. Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, Cianciolo GJ and Day NK: Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92: 3611-3615, 1995
31. Simone E, Daniel D, Schloof N, Gottlieb P, Baba S, Kawasak E, Wegmann D and Eisenbarth GS: T-cell receptor restriction of diabetogenic autoimmune NOD T cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2518-2521, 1997
32. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC and Power RF: IFN- γ gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlate with autoimmune diabetes in non obese diabetic mice. *J Immunol* 154: 4874-4882, 1995
-