

計畫編號：DOH88-TD-1085 和 DOH87-TD-1035

行政院衛生署八十七~八十八年度科技研究發展計畫

HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 之功能與病毒蛋白間作用之探討

計畫名稱

研 究 報 告

執行機構：中央研究院生物醫學科學研究所

計畫主持人： 陳 士 隆

研究人員：

執行期間：86 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

＊ ＊ 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 ＊ ＊

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、摘要	(3-5)
(一) 中文摘要	(3-4)
(二) 英文摘要	(4-5)
貳、報告內容	(5-)
(一) 前言	(5-6)
(二) 材料與方法	(7-10)
(三) 結果	(10-15)
(四) 討論	(15-17)
(五) 結論與建議	(17)
(六) 參考文獻	(17-20)
(七) 圖表	(21-41)

共 (41) 頁

壹、摘要

(一) 中文摘要

關鍵詞：人類後天免疫缺乏病毒；鞘膜蛋白 gp41；細胞質內區域；細胞間質蛋白 MA；蛋白質間相互作用；自行組裝能力，聚合物

Retroviruses 如 HIV-1 在 morphogenesis/assembly 過程中之分子機制仍不甚清楚，一些間接證據顯示 HIV-1 gp41 之細胞質內區域 (cytoplasmic domain) 和 matrix protein MA 之間有相互作用。為證實此說法，在第一年的計畫劃裡，我們首先以 yeast two-hybrid 系統來探討此二蛋白在 *in vivo* 狀態下之可能相互作用。然我們無法觀測到此二者間之結合作用，其原因可能是 MA fusion protein 無法在 yeast 內表達。接著我用 *E. coli* 表達系統來表達 MA 和 gp41 cytoplasmic domain 之不同區域，再以免疫共同沉降法 (immuno-coprecipitation) 發現含 gp41 cytoplasmic domain 之 C 端部分之蛋白 (如含氨基酸 789 至 856) 可與 MA 共同沉降，然 gp41 cytoplasmic domain 之 N 端對二者間之相互作用並不重要。接著我們用 ELISA 之方法發現含氨基酸 706 至 775 之 fusion protein 可與 MA 結合而含 706 至 752 之 fusion protein 則無法和 MA 結合，此結果顯示氨基酸 752 至 775 在 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 之結合中至為重要。

為了解 gp41 cytoplasmic domain 在病毒複製初期過程中所具功能之分子機制，在第二年計劃裡我們探討了 cytoplasmic domain 對 gp41 所引起病毒進入細胞之重要分子構造。為達成此目的，我們用 PCR 方法將整個 cytoplasmic domain 選殖 (cloning) 出來並插入 pMal 內 *mal E* gene 之 3' 端，而 *mal E* 所 encode 之 maltose-binding protein (MBP) 為 monomeric form。當所插入之蛋白質序列具有 oligomerization 之能力時會使整過 MBP fusion protein 聚合成一 oligomer，我們用 sucrose gradient centrifugation、chemical cross-linking 和 gel filtration 來分析所 encode 之 MBP/706-856 fusion protein，發現 MBP/706-856 為一 oligomer。此外，我們也分析由 N 端或由 C 端一系列 cytoplasmic domain deletion mutant 時，發現由第 706 至 752 氨基酸序列不具 oligomerization 之能力而由 753 至 856 之氨基酸序列則含有 multiple oligomerization 之 signal，其內之二個 amphipathic α -helix，稱 LLP-1 和 LLP-2，具有 oligomerization 之能力。而當 LLP-1 和 LLP-2 之 C 端有缺失時，其 oligomerization 之能力則消失或受到極大之影響。

我們的實驗結果顯示 HIV-1 gp41 之 cytoplasmic domain 具有自行組成 oligomer 之能力，且其內之 LLP-1 和 LLP-2 在 cytoplasmic domain 之

oligomerization 上具有極重要之角色。我們目前的實驗結果和過去的實驗吻合，支持了「HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 組裝成一 oligomeric 構造是病毒具有感染力所需要的」之論點。

(二)英文摘要

Keywords: HIV-1; gp41 cytoplasmic domain; matrix (MA) protein; MA-gp41 cytoplasmic domain interaction; self-assembly; multimerization; α -helix

The overall objectives of this project is (A) to study the specific interaction between gp41 cytoplasmic domain and MA and (B) to determine whether the cytoplasmic domain is able to self-assemble into a high-ordered structure. Toward the first objective, biochemical and genetic approaches including a yeast two-hybrid system and a procaryotic expression system were employed to examine the interaction between these two entities. When the coding sequences of different regions of the gp41 cytoplasmic domain and MA were cloned into various yeast two-hybrid plasmid pairs, we could not detect the interaction between fusion proteins containing these two entities. Using an *E. coli* expression system, we found that fusion proteins containing the C-terminal portion of the gp41 cytoplasmic domain, e.g., amino acid residues 789 to 856, were able to bind to MA when immuno-coprecipitation was performed. We further demonstrated that amino acid residues 752 to 775 were crucial for this interaction when an ELISA format was employed. This study indicates that gp41 cytoplasmic domain can interact with MA by using an *in vitro* protein binding assay. Based on these findings, we feel that it is of importance to further demonstrate the *in vivo* interaction between gp41 cytoplasmic domain and MA and to delineate sequences or amino acid residues in the gp41 cytoplasmic domain which are crucial for this interaction.

To achieve the second objective, we fused the coding sequence of the entire cytoplasmic domain at 3' to the *Escherichia coli* *malE* gene which encodes a monomeric maltose-binding protein. The expressed fusion protein was examined by chemical cross-linking, sucrose gradient centrifugation, and gel filtration. The results indicated that the cytoplasmic domain assembles into a high-ordered structural complex. Moreover, we demonstrated that sequences encompassing the lentiviral lytic peptide-1 and lentiviral lytic peptide-2, which are located to residues 828-856 and 770-795, respectively, play a critical role in cytoplasmic domain self-assembly. These results indicate that the cytoplasmic domain of gp41 by itself is sufficient to

assemble into a high-ordered multimeric structure. The present study also supports the notion that a multimeric form of the gp41 cytoplasmic domain plays a crucial role in viral infectivity.

貳、報告內容

(一)前言

人類後天免疫缺乏病毒型 1 (HIV-1) 之膜糖蛋白 [envelope (Env) glycoprotein] 中之膜鞘蛋白質 (transmembrane protein, 簡稱 TM 蛋白) gp41 之細胞質內區域 (cytoplasmic domain) 位於氨基酸序列 706 至 856 位置, 其內含與產生免疫反應, 如病毒中和、B 細胞活化和免疫抑制 (immunosuppression) 之區域。此外, gp41 cytoplasmic domain 含二 amphipathic α -helix, 分別位於氨基酸位置 828 至 856 及 770 至 795, 此二區域又稱 lentivirus lytic peptide (LLP)-1 及 LLP-2。現已知 gp41 cytoplasmic domain 內之一些 structural motif 和 T 細胞死亡有關。

gp41 cytoplasmic domain 在病毒生長週期中至為重要, 其主要功能為參與病毒複製 (replication)、感染性 (infectivity) 和引起細胞病變 (cytopathogenicity) 之作用 (Fisher et al., 1986; Terwilliger et al., 1986; Lee et al., 1989)。此外, 此區域與病毒傳怖、Env protein 之 stability 和 Env 組裝 (incorporation) 至病毒顆粒有關 (Kowalski et al., 1987; Helseth et al., 1990; Dubay et al., 1992; Gabuzda et al., 1992; Yu et al., 1993)。最近的報告指出此區域含一近細胞膜之 tyrosine-based 之訊號 (signal), 此 signal 可決定病毒在極化 (polarized) 細胞如 MDCK 內之 basolateral targeting (Lodge et al., 1997)。此外, 依據 LLP-1 和 LLP-2 所合成之 peptide 具有 cytolytic 和 calmodulin-binding 和 -inhibitory 之性質 (Srinivas et al., 1993; Tencza et al., 1995)。

另一方面, HIV-1 之 matrix protein MA 位於病毒套膜 (envelope) 之內面且由其 N-端所接之 myristic acid 而與 lipid bilayer 結合。MA 在病毒生命週期中具有重要之功能如病毒組裝 (Bryant and Ratner, 1990; Yuan et al., 1993; Freed et al., 1994; Spearman et al., 1994; Freed and Martin, 1996)、病毒進入細胞 (Yu et al., 1992a)、細胞核傳送 (nuclear localization) (Bukrinsky et al., 1993) 和 Env 裝配至病毒體 (Yu et al., 1992b; Dorfman et al., 1994)。因 MA 與 gp41 cytoplasmic domain 在病毒顆粒內之分佈位置相近, 故此二個蛋白 segment 被認為會有相互間之作用。目前有一些證據支持此說法。在 HIV-1, gp41 cytoplasmic domain 若有缺失 (deletion) 或 MA 有變異, 則會減少 Env 之組裝至病毒體 (Dubay et al.,

1992; Yu et al., 1992b; Yu et al., 1993; Dorfman et al., 1994; Freed and Martin, 1995; Freed and Martin, 1996)。此外，因受 MA mutation 影響而減少 Env 組裝至病毒體可因把 gp41 cytoplasmic domain 平截 (truncation) 而恢復 (Freed and Martin, 1995; Mammano et al., 1995; Freed and Martin, 1996)。HIV-1 Env 組裝至 visna-HIV-1 之嵌合 (chimera) 病毒顆粒可因 HIV-1 MA 之存在而增加 (Dorfman et al., 1994)。此外，gp41 cytoplasmic domain 內存在一些氨基酸序列可引導病毒體由極化表皮細胞之 basolateral 表面 budding。由這些實驗顯示 HIV-1 gp41 之 cytoplasmic domain 和 MA 之間可能有相互之作用，但仍缺少直接的佐證。故本計劃之第一年目的為以各種生化的和遺傳性的方法來探討 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之相互作用，此方面之研究有助於進一步了解病毒在 morphogenesis 及組裝過程中之分子機制及發現新的抗愛滋病毒標的。

另一方面，我們發現一 HIV mutant provirus 稱 HXV-m 其所 encode 之 Env protein 缺少 gp41 cytoplasmic domain，當此 mutant provirus 和 wt provirus 一起 coexpress 時，所產生 mixed virus 之 infectivity 則較 wt 病毒感染力為低。當此 mutant provirus 所 encode 之 truncated Env mutant 和 wt Env 一起 coexpress 時會 dominantly 抑制 wt Env 所引起病毒進入細胞之能力。此外，我們也證明了 wt 和 mutant Env 會形成一異聚合物 (hetero-oligomer)。這些實驗結果顯示了 cytoplasmic domain 組合成一 oligomer 是病毒具 infectivity 所需的。但過去的 mutagenesis study 推論 HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 與 Env oligomerization 無關，而目前已知 HIV Env 之 oligomerization site 是位於 gp41 ectodomain 之 leucine zipper motif 和近膜之 C-terminal α -helix。

本計劃之第二年目的原擬以 gp41 cytoplasmic domain truncation Env mutant 作為一模型系統以探討 cytoplasmic domain 在病毒複製初期過程中之分子機制，我們準備以 wild-type (wt) 病毒及混合型病毒，其 membrane 表面帶有 wt 及 truncated Env mutant 來感染細胞並以各種形式之 PCR format 研究病毒 DNA 生合成及內嵌至細胞染色體之差異情形，但在實際研究過程中，我們遭遇到如下之困難：因 HIV 在細胞中經由 transfection 所得到之病毒 titer 極低，無法作有效的感染。當 CD4⁺ 細胞中只有極低比例之細胞被病毒感染時也增加了 PCR detection 的困難度，而常有 contamination 的問題發生。為了不致擔誤實驗之進行，我們稍為 shift 了一下研究手段，改為探討 gp41 cytoplasmic domain 是否可自行 assemble 為一 oligomer。對 cytoplasmic domain structure 之了解，有助於對此區域在病毒感染初期過程中之作用，進而研發針對此區域之藥物或抗愛滋病毒策略。

(二)材料與方法

I. cytoplasmic domain – MA 之探討

A. Yeast two-hybrid 質體 (plasmid) 之分子選殖 (cloning)

首先我們用 PCR 以 HXB2 作模板 (template) 來增殖 (amplify) encoding gp41 cytoplasmic domain 內不同區域和 MA 之 DNA 片斷 (fragment)。接下來則將各種 PCR 增殖出之 DNA 片斷選殖至如表 1 所示之 gal 4 promoter-based 之 yeast two-hybrid 質體上。表 1 並列出 two-hybrid 質體內所 encode 之 selection marker。DB 表示 DNA-binding domain 而 AD 表示 activation domain。如表 2 列示，為使偵測 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 作用具 flexibility，我們也將 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 之 encoding DNA 片斷接至以 LexA promoter-based 之 yeast two-hybrid 質體上。此外，我們也以 PCR 在 gp41 cytoplasmic domain 或 MA 與 DNA-binding domain 或 activation domain 間加入一個 encode 4 個 glycine 之 DNA 片斷之質體 (質體名稱後加 L 符號以與不 encode 4 個 glycine 之質體區分)，如表 3 所示。

B. pET32a(G-tag) 和 gp41 cytoplasmic domain-encoded 之 pET32(G-tag) 衍生質體之分子選殖

為了使含 gp41 cytoplasmic domain 不同區域之蛋白質能以細菌大量表達，我們選擇 pET32a 作為選殖載體 (cloning vector)。此載體可 encode thioredoxin、His-tag 及 S-tag 等，並 encode thrombin 和 enterokinase 等 cleavage site，可用以切除 target protein 前端之 fusion protein。此載體前端含 T7/lac promoter 及 lac repressor (*lacI*)，可在 BL21(DE3) pLysS 和 BL21(DE3) pLySE 等 host 細胞以 IPTG induction 來表達。用此質體表達 target protein 之好處為其所 encode 之 thioredoxin fusion protein 為水溶性可提高擬表達 protein 之 solubility。

為了容易確認所表達出之 fusion protein，我們在此載體之 *Bgl*III 及 *Kpn*I site 間加入了一個可 encode VSV Env protein G 之 C 端 15 個氨基酸之 DNA 片斷，故所表達出 fusion protein 可以用 rabbit anti-G(COOH) (Chen et al., 1986) 來確認。此外我們也自以 PCR 產生不同 gp41 cytoplasmic domain-coding region 之各種 pET32a(G-tag)/Env 質體如圖 1 所示。

C. Cloning of pET32a(Ch13-tag) 及其可表達 MA 之質體

為使由 pET32a 所表達出之 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 能以簡易方法區分，我們另將一 HIV-1 gp120 之單株抗體 Chessie 8 之 epitope 的 DNA coding sequence 插入 pET32a 之 *Kpn*I 和 *Bgl*III site 內。此段 DNA 所對應的蛋白質序列相當於 HXB2 strain Env 之第 252 到第 273 個氨基酸，所產

生之質體稱 pET32a(Ch13-tag)。然後我們將 encode MA 之 coding sequence 由 yeast two-hybrid plasmid pGB79 以 *Bgl*III 和 *Kpn*I 切下並接至此 vector 而成 pET32a(C13-tag)/MA plasmids。由此質體所表現出的 MA fusion protein 其 N 端會額外帶有 187 個氨基酸。

D. 蛋白質表達及純化

將 pET32a(G-tag)/*Env* 系列的質體或 pET-MA 質體轉形 (transform) 進入 BL21(DE3)pLysS 中，以 0.5mM IPTG 在 30°C 處理 3 小時，誘發 *Env* protein 的表現，以 Sonication buffer (0.1M NaCl, 50mM Tris, pH8.0, 0.1% Triton X-100) 打散均勻，sonicate，保存於 -20°C。以 coomassie blue 或 Western blot 確定蛋白質的表現。

將已誘發目的蛋白質表現的 cell lysate 高速離心，去除 debris 後，通過 0.45μm filter。將此蛋白質樣品加入 5mM imidazole 後，通過 TALON column，其 resin 上帶有鈷離子 (Co^{2+}) 可和 $(\text{His})_6$ -tag 鍵結，使目的蛋白質可以附著在 TALON column 上。加入 5mM imidazole 之目的在於降低非特異性 (non-specific) 的鍵結 (binding)。在蛋白質樣品重複通過 column 兩次之後，以成分相同的 sonication buffer 加以清洗至偵測的 UV 吸光值降至原先的背景值。之後，以階梯式的 buffer 將目的蛋白質析出。此階梯性的 buffer 分別是 (1) 20mM imidazole, 0.3M NaCl, 50mM Tris, pH7.5, 0.1% TritonX-100; (2) 50mM imidazole, 0.5M NaCl, 50mM Tris, pH7.0, 0.1% TritonX-100; (3) 100mM imidazole, 0.5M NaCl, 50mM Tris, pH7.0, 0.1% TritonX-100; (4) 200mM imidazole, 0.5M NaCl, 50mM Tris, pH7.0, 0.1% TritonX-100。

E. 免疫共同沉澱法 (immuno-coprecipitation)

Protein A-Sepharose 經 PBS 洗過之後，分別和 rabbit anti-G(COOH) (或 rabbit anti-MA) 混合在 4°C 搖晃超過 1 小時，以 PBS 清洗。Beads 再分別和 MA (或 gp41 cytoplasmic domain) 之蛋白片斷作用。Beads 經 PBS 清洗後離心，加入 2X Lammei buffer 以 95°C 水浴處理 5 分鐘後，跑 SDS-PAGE 並轉移至 NC paper，以 anti-MA (偵測 MA) [或 anti-G(COOH) (偵測 gp41 cytoplasmic domain)] 作 Western blot 來觀察欲測試的蛋白質是否有和目標抗原有結合。

F. ELISA

特定蛋白質或 cell lysate 以 PBS 稀釋，靜置於 ELISA plate 上，4°C，overnight。然後以 wash buffer (PBS 含 0.05% Tween20) 清洗，再以 PBS 含 5% 之 low-fat milk blocking 於室溫 1 小時。再用預測試的特定蛋白質或 cell lysate (亦以 PBS 稀釋)，incubate 於室溫 2 小時，接下來，則用特定的抗體

加以辨識，最後則用 OPD 呈色，並以 3M HCl 終止反應。最後以 492nm 的可見光加以讀值。

II. cytoplasmic domain self-assembly 之探討

A. 基質建構 (plasmid construction)

為了解 HIV-1 之細胞質內區域是否具有 self-assembly 之能力，我們首先以 PCR 將整個 cytoplasmic domain 之 coding sequence 選殖出來，並如圖 2A 所示，插入於含 *E. coli malE* gene 之 pMal-C2 基質 (簡稱 pMal) polycloning site 內之 *EcoRI* 和 *SaII* 位點內。*mal E* 表達 monomeric 之 MBP 而產生之 MBP/706-856 為一 fusion protein，即 cytoplasmic domain 之 N 端接 MBP。為了作 multimerization 之 negative control，我們也把 gp120 上之一 epitope 即由 252 至 273 氨基酸之 coding sequence 以 PCR 選殖出來並 clone 至 pMal。此外，為了建構以 pET21 (a) 為 base 之建構，我們以 PCR 方法產生 DNA fragment 並 in frame 接至 pET21 (a) 之相對 cloning site 上，故其 encode 之 cytoplasmic domain fragment 其 N 端接含 T7 tag 之 16 個氨基酸而 C 端則接含 6 個 histidine 之 tag。為了解 cytoplasmic domain 內那一區域是 multimerization 所必需的，我們作了可 encode N 端和 C 端一系列 deletion 之 pMal mutant (如圖 2B 所示)。

B. Fusion protein 之表達及純化

我們把 pMal/cytoplasmic domain 或 pET21(a)/706-856 之基質先轉殖 (transform) 至 competent NM522 或 AD494，並以 IPTG induction 所 encode 之 fusion protein。含 MBP fusion protein 之菌體則以十分之一於菌體體積之含 1 mM PMSE 的 PBS resuspend 再 sonicate 至 >95% 細菌細胞壁破裂，經離心後其上層澄清液 (supernatant) 則儲存於 -20°C 備用。若欲純化 MBP fusion protein，則於 induction culture 中加入最終濃度為 0.2% 之 glucose。由 pET21(a)/706-856 所轉殖之菌體經 IPTG induction 後以菌體體積十分之一量之 Tris/HCl buffer (pH 7.0) 內含 0.1M NaCl 和 1mM PMSF sonicate。由 pMal constructs 所 encode 之 fusion protein 以 amylose resin (New England Biolabs) 之 affinity column 純化，而由 pET21(a)/706-856 所 encode 之 fusion protein 則以 Talon metal resin (Clontech Laboratories, Inc.) 之 affinity column 純化。純化此二類 fusion protein 之步驟則依製造者所提供之步驟進行。

C. Chemical cross-linking

純化之 MBP/706-856 fusion protein (溶於 PBS 內) 則和不同濃度之 glutaraldehyde 於冰上反應 30 分鐘，再加入最後濃度為 100 mM 之 glycine (pH8.0) 以終止 cross-linking 反應，再以 SDS-PAGE 分析所 cross-link 之蛋白。

D. Sucrose gradient centrifugation

將純化或未純化之 fusion protein 和已知沉降系數 (sedimentation coefficient) 之蛋白質 marker 置於 20% 至 45% 之 sucrose gradient 上，並於 40,000 rpm 在 4°C 下離心 20 個小時。離心後由 gradient 之底部開始收集蛋白質，由每管取 50 至 200 μ l 之體積並以 5 倍體積之 cold acetone 作沉澱，所沉澱下之蛋白質再以 SDS-PAGE 及 Western blotting (利用 MBP 和 Chessie 8 等單株抗體) 作定性分析。

E. Size-exclusion chromatography

我們把含 25 至 100 μ g 之純化 MBP fusion protein 或由 pET21(a) 所 encode 之純化蛋白 (溶於 200 μ l 之 PBS 內) 打入 Superose 6 HR column (10 x 300 mm; Pharmacia) 並以 Pharmacia 之 fast protein liquid chromatography (FPLC) (配以 UV monitor 及 pump) 以每分鐘 0.5 ml 之流速於室溫下流出，流出之液體則每分鐘收集一管。所收集之蛋白標本則以 SDS-PAGE 和 Western blotting 作分析。此外，並以已知分子量之蛋白質 marker 作 column 之 calibration，由 UV 之圖譜可求出 fusion protein 和蛋白質 marker 其主峰 (peak) 所 elute 出來之時間。

(三)結果

I. cytoplasmic domain - MA 相互作用之探討

A. 以 yeast two-hybrid 系統來探討 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之相互作用

為研究 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之可能相互作用，首先我們採用 yeast two-hybrid 之 *in vivo* interaction assay。如表 1 和 2 所示，我們把 encode gp41 不同區域及 MA 或 MA-capsid protein (CA) 之 DNA 片斷以分子選殖的方式插入以 gal4 DNA-activation domain 和 DNA-binding domain 及以 LexA DNA-binding domain 和 B42 acid path trx activation domain 為基礎之不同載體。接下來，我們以不同 strain 之 yeast 為 host cell，分別以可 encode 不同區域之 gp41 cytoplasmic domain 或 MA 之 yeast two-hybrid plasmid 作初級質體 (如表 3 所示) 來 transform yeast，以缺 tryptophan 之培養基來作 selection。所挑選出之 transformant 再以表 3 所示之 yeast two-hybrid 質體其可 encode 不同區域之 MA 或 gp41 cytoplasmic domain 之質體來作第二次轉形，再以缺 leucine 之培養基來作培養，所挑選出之 transformant 再以缺 histidine 之培養基來作 selection。如 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 有作用則會形成一個 functional 的轉錄活化因子而打開 His 3

gene 前含 gal4 responsive element 之 promoter，故由二次質體轉形所得之 transformant 應可在缺 histidine 之培養基生長。不管第一質體為 encode gp41 cytoplasmic domain 第二質體為 encode MA 或第一質體 encode MA 而第二質體 encode gp41 cytoplasmic domain 所作之組合都無法看到經二次轉形之 transformant 可生長於缺 histidine 之培養基中，為了使表達之含 gp41 cytoplasmic domain 或 MA 與 gal 4 DNA-activation domain 或 DNA-binding domain 間之距離較具伸縮性，我們也以 PCR 於 pGBT9 質體內插入一個 encode 4 個 glycine 之 DNA 片斷 (表 3 內質體名稱後面加 L 符號者) 後再作 gp41 cytoplasmic domain 或 MA-coding sequence 之分子選殖，但此作法並沒有觀察到可生長於缺 histidine 之二次 transformant。同時我們也以 yeast two-hybrid 質體分別 encode SV40 之 T antigen 和 p53 作 control，結果此 double transformant 可生長於缺 histidine 之培養基中。

為了解此種 negative 之結果是因為 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間沒有相互作用，或是 gp41 cytoplasmic domain 或 MA 沒有表達，我們把經各種質體轉形後的 yeast 磨碎，將 cell extract 跑 SDS-PAGE，再以 anti-gp41 (for gp41 cytoplasmic domain) 或 anti-p17 (for MA)，或 anti-p24 (for MA-CA) 作 Western blotting，結果發現 encode gp41 cytoplasmic domain 之 fusion protein 有表達，而 encode MA 或 MA-CA 之 fusion protein 並沒有表達。我們不清楚其原因，但由 yeast two-hybrid encoding MA 之質體所切下之 MA coding sequence 若分子選殖至細菌的表達質體內則發現有 MA 之表達 (見 B 部份)。

B. 以 in vitro 蛋白質結合來探討 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 之相互作用

我們以細菌表達系統 pET32a 來表達不同區域之 gp41 cytoplasmic domain 和 MA，為了偵測這些 recombinant 蛋白方便起見，我們先合成正反向之 encoding VSV G protein C-端 15 個氨基酸之二條 oligonucleotide，先使其 5' 端磷酸化，denature，再配對 (anneal)，最後把此雙股 DNA 片斷接進 pET32a 之 *Bgl*III 和 *Kpn* site，並以 DNA 判序 *E. coli* BL21(DE3) 轉形，IPTG induction，SDS-PAGE 和 Western immunoblotting 等步驟，選殖出一個正確的 clone。接著我們把不同 yeast two-hybrid 質體其可 encode 不同大小之 gp41 cytoplasmic domain 之 DNA 片斷以 *Eco*RI 和 *Sal*I 切下，並插入 pET32a (G-tag) 載體 (圖 1)，此外我們也用 PCR 的方式增殖出 804 至 856 及 815 至 856 之 DNA coding 片斷並插入 pET32a(G-tag) 載體。另外，為了表達不同程度之 gp41 cytoplasmic domain 平截式之 mutant，我們也以 PCR 用由 HXB2 strain 所產生之諸 TM mutant (Yu et al., 1992b) 作模板產生 DNA 片斷並插入 pET32a(G-tag) 載體。這些 plasmid 都轉形至 BL21(DE3)pLysS

細菌並以 IPTG induction、Commassie blue 染色及 Western blotting 等步驟證明這些 plasmid 可表達 gp41 cytoplasmic domain (圖 3A 至 C)，且所表達出蛋白之分子量大小是預期的。

另一方面，爲了簡易偵測所表達出之 MA，我們以 PCR 增殖一段能 encode gp120 氨基酸 252 至 273 位置之 DNA 片斷並插入 pET32a 載體內，此 pET32a(Ch13) 所表達之蛋白質可以 Chessie 13 Mab 來偵測。接著我們把含 MA 氨基酸 1 至 132、1 至 104 和 1 至 88 之 coding DNA 片斷切下並插入 pET32a(Ch13-tag) 以產生各種 pET32a(Ch13-tag)/MA 之表達質體。這些質體所表達之 fusion 蛋白質可以用 rabbit anti-MA 來偵測 (圖 4)。

爲了解 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之相互作用，首先我們以免疫共同沉澱法來證明。我們把 protein A-Sepharose 的 beads 先以 rabbit anti-p17 之抗體來 coating，清洗過後的 beads 再和純化的 p17 作用，此所純化之 p17 N 端不帶有 fusion protein。Beads 經清洗後再和含 gp41 cytoplasmic domain 706-856、760-856 和 789-856 之 crude cell lysate 作用，經 PBS 洗過後，beads 經 95°C 加熱，所釋出之蛋白跑 SDS-PAGE 並以 rabbit anti-G(COOH) 或人類 anti-HIV 作 Western blotting。不管用何種抗體都可看出含 gp41 cytoplasmic domain 之蛋白片斷可被偵測出，但只含 control G-tag 之蛋白則無法被看到 (圖 5A, lane1)，此現象顯示 MA 和 gp41 之 cytoplasmic domain 有作用。但若 MA 蛋白改由 pET32a(Ch13)/MA 所表達之蛋白來作，則結合的現象就不易看到，因 pET32a(Ch13-tag)/MA 所表達出之 MA 其 N 端含有 fusion protein 不是 free 的，此 fusion protein 可能使 MA 之 N 端藏於分子內部不能顯露出來故無法和 gp41 cytoplasmic domain 作用。

爲進一步了解 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之作用，我們以 ELISA 方法作 *in vitro* 蛋白質結合。首先我們把純化過的其 N-端爲 free 的 MA (濃度爲 0.6 mg/ml) 先以 PBS 稀釋 1:50，再用 100 μ l coating 至 ELISA plate 上，接著和稀釋 10 倍其內含不同 gp41 cytoplasmic domain 區域之 fusion protein 之細胞抽取液作用，再與兔子 anti-G(COOH) 血清及 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit 之 IgG 作用，最後以 ECL 基質作呈色反應。由表 4 顯示，含 cytoplasmic domain 706 至 856、760 至 856 及 789 至 856 之 fusion protein 都可和 MA 結合，而只含 G-tag 之 fusion protein 則無法和 MA 結合。

爲了解 gp41 cytoplasmic domain 之那一區域對此作用有重要性，我們用其 C 端有不同程度缺失之 gp41 cytoplasmic domain 的 fusion protein 來與 MA 作結合。如表 5 所表示，去掉氨基酸 775 至 856 並不影響與 MA 之

結合，然去掉氨基酸 752 至 856 則使與 MA 之結合喪失。此結果顯示氨基酸 752 至 775 在 gp41 cytoplasmic domain 與 MA 結合上至為重要。

II. Cytoplasmic domain self-assembly 之探討

A. MBP fusion protein 之建構及表達

為了解 gp41 cytoplasmic domain 在病毒複製初期過程中所具功能之分子機制，第二年計劃為探討 cytoplasmic domain 內之 autonomons 構造和 oligomerization 之 domain。為達成此目的，我們以 PCR 將 HXB2 strain Env 由第 706 至第 856 氨基酸之 cytoplasmic domain 的 coding sequence 選殖出來，並接至 pMal pycloining site 內之 *EcoRI* 和 *SaII* 上 (圖 2A)。另外，我們也把單株抗體 chessie 13 之 epitope，即位於 Env 之第 252 至第 273 氨基酸之 coding sequence 選殖出來並插入於 pMal 基質 (圖 2A)。pMal/706-856 與 pMal/252-273 分別 encode 542 和 413 個氨基酸。接著我們以 pMal、pMal/706-856 與 pMal/252-273 等基質分別轉殖 (transform) competent AD494 細胞，並以 IPTG 作 induction，所表達之蛋白質以 7.5% SDS-PAGE 分離。pMal、pMal/706-856 和 pMal/252-273 所 encode 蛋白之視 (apparent) 分子量分別為 45 kDa、56 kDa 和 40 kDa。

B. MBP/706-856 之 sucrose gradient 分析

為了解 cytoplasmic domain 是否可自己組裝成一 oligomer，我們把所表達之 MBP/706-856 fusion protein 和蛋白質分子量 marker 以 20% 至 45% 之 sucrose gradient 作沉降 (sedimentation)，再由底部收集，且以 7.5% SDS-PAGE 分析。如圖 6 top panel 所示，MBP/706-856 沉降位置比 catalase 還快，顯示 MBP/706-856 可能形成比 tetramer 還大之 species。若 MBP/706-856 先以 1% SDS 處理，則此 fusion protein 沉降在第 21 至 23 管，此為 MBP/706-856 monomeric form 所沉降之位置 (圖 6，bottom panel)。當 MBP/252-273 fusion protein 以相同情況作沉降時，不管是否有以 SDS 作處理，其沉降皆在第 21 至 23 管 (圖 7)，顯示此 MBP/252-273 為 monomer。

C. MBP fusion protein 之純化及四級構造之分析

為了解 MBP fusion protein 之生化性質，所表達出之 MBP 及 MBP fusion proteins 以 amylose affinity column 純化並以 SDS-PAGE 及 coomassie brilliant blue 染色。MBP、MBP/706-856 和 MBP/252-273 則 migrate 為主要單一之 species。為排除由圖 6 所觀察到之 MBP/706-856 沉降至 gradient 下方是因與細胞蛋白結合所致，我們也以經純化之 MBP/706-856 作 sucrose gradient 分析。純化之 MBP/706-856 沉降之主峰 (peak) 仍在第 9 至 11 管，顯示 MBP/706-856 確實為 oligomer。此外，我們也以 glutaraldehyde 作

cross-linking。由圖 8 所示，MBP/706-856 可被 cross-link 至高分子量。

D. MBP fusion protein 之 gel filtration 分析

為了解 MBP/706-856 之 high-ordered multimeric structure，我們把純化之 MBP/706-856 及分子量 marker 以 superose 6 HR column 作 gel filtration 並配以 FPLC 作分析。MBP/706-856 之 peak 於第 15.4 分鐘被 elute 出來 (圖 9, top panel)，比 blue dextran 之 peak 於 16.4 分鐘被 elute 出來稍快。當以 Western blotting 分析所 elute 出之蛋白時，MBP/706-856 在第 17 管開始出現 (圖 9, bottom panel)，此與其第 15.4 分鐘被 elute 出之觀察穩合，因由 UV detector 至 fraction collector 約有 1 至 2 管之時間差異。另外，MBP/252-273 的 peak 則於第 33.5 分鐘被 elute 出來 (圖 10, top panel)，Western blotting 檢測其出現之管數在 35 至 37 管 (圖 10, bottom panel)。

為進一步了解 cytoplasmic domain 確實會形成一 high-ordered 構造，我們把 706-856-coding sequence clone 至 pET21(a) vector 內，此基質所 encode 之 cytoplasmic domain 其 N 端有一包括 T7 tag 之 16 個氨基酸及 C 端接有一 6 個 histidine tag 之 15 個氨基酸。T7 和 His 二個 tag 並不具有 oligomerization 之能力。經 Talon affinity column 純化之 fusion protein 則以 Superose 6 column 作 gel filtration，此 fusion protein 之 subunit 分子量約為 18 kDa。由圖 11 所示，此 fusion protein 之 elution peak 在第 25-27 管。當由已知 marker 之分子量取 log 值並與其 peak 所 elute 出之時間作圖時，求得此 fusion protein 之分子量約為 400 至 630 kDa，顯示 cytoplasmic domain 確實會形成一 high-ordered structure。

E. Mapping multimerization domain

接著我們想知道在 cytoplasmic domain 內那些區域與 multimerization 有關，我們用 PCR 作了一系列的由 N 端切除或由 C 端切除之 pMal 基質 (圖 2B)。所表達出之 fusion protein 則先以 sucrose gradient 作分析，所 fractionation 出之 protein sample 再以 SDS-PAGE 及 Western blotting 利用特異性之抗體如 anti-MBP、chessie 8 及 anti-HIV 作偵測。由圖 12 所示，除了 MBP/706-752 是沉降在 gradient 之近上方外，其餘的 MBP fusion proteins 皆沉降在 gradient 之下方並比 catalase 沉降還快，顯示這些 fusion protein 之分子量比 catalase 還大。此實驗結果顯示氨基酸 706 至 752 對 cytoplasmic domain 之 multimerization 並不重要，但氨基酸 753 至 775 卻有使 monomeric 之 MBP 轉變成 multimer 之能力。

為了解 LLP-1 和 LLP-2 是否可 mediate multimerization，我們以 sucrose gradient centrifugation 分析了 MBP/816-856 與 MBP/760-795 兩個 fusion

protein 之 oligomerization。結果發現此二 protein 皆沉降在 gradient 的下方，顯示此二 region 分別具 multimerization 之能力 (圖 13)。為進一步了解 LLP-1 和 LLP-2 是否此 multimerization 所必需的，我們分析了 MBP fusion protein MBP/816-844 和 MBP/760-775。此二 fusion protein 所 encode 之 LLP-1 和 LLP-2 分別在 C 端有 deletion。結果發現 MBP/816-844 是 monomer 而 MBP/760-775 大部分為 monomer 而有一小部份是以 low-ordered oligomer 形式存在 (圖 13)。顯示了 LLP-1 和 LLP-2 分別在 multimerization 中具有極重要之角色。

(四) 討論

本計劃之綜合目的在探討 gp41 cytoplasmic domain 與 MA 之相互作用及 cytoplasmic domain 自身結合之情形。針對第一個目的，我們採用了 yeast two-hybrid system 和以細菌所表達的蛋白來作 *in vitro* protein binding assay，然 yeast two-hybrid system 卻沒有辦法 detect 到二者間之相互作用。其可能原因是 MA 無法在 yeast 內表達，而這些 encode MA 之 yeast two-hybrid 質體在 DNA-binding domain 或 DNA-activation domain 與 MA coding sequence 間之 DNA 序列與 MA 本身 coding DNA 序列也經 DNA 定序證明是對的，而這些 MA-coding 序列若由 yeast two-hybrid 質體內切下並接至 pET32a(Ch13-tag) 也能在 *E. coli* 內表達 (圖 4)，目前這些 encoding MA 之 yeast two-hybrid 質體為什麼在 yeast 內不產生 MA 之原因仍不清楚。

我們用免疫共同沉降法先把純化的 MA 以抗 MA 抗體先結合至 protein A-Sepharose 再和 gp41 cytoplasmic domain 作用則可證明 MA 可和 gp41 cytoplasmic domain 706 至 855 結合 (表 4)，而 gp41 cytoplasmic domain 之 N 端對此結合並不重要，而 C 端與結合有關。此可由只含 gp41 cytoplasmic 760 至 855 或 789 至 855 之 fusion protein 即可和 MA 作用 (表 4)。此外，氨基酸 752 至 775 是此相互作用所需的，因含氨基酸 706 至 775 之 fusion protein 可和 MA 結合，而含氨基酸 706 至 752 之 fusion protein 卻無法和 MA 結合 (表 5)。另一方面，若 G-tag/Env 蛋白先和 beads 結合，再和純化的 MA 蛋白混合作用，再以 Western 方法偵測但無法看到 MA 的存在。為什麼由一個方向來作可看到 env 和 MA 有結合的現象，但由另一個方向來作就看不到，其原因尚不明瞭。

針對第二個目的，我們以 monomeric 之細菌 MBP fusion protein 表達系統來探討 HIV-1 gp41 之 cytoplasmic domain 是否可自行組裝成一 oligomer。由 sucrose gradient centrifugation、chemical cross-linking 和 gel filtration 等方法得

知 cytoplasmic domain 具有使 MBP 轉變成一 high-ordered structure 之能力 (圖 6、圖 8、圖 9 與圖 11)。此外，由一系列 N 端或 C 端 deletion mutants 之研究得知，氨基酸 706 至 752 並不具有 self-assembly 之能力 (圖 12)，而氨基酸 753 至 856 則具有多個 multimerization 之 sequence (圖 12)。另外我們也 map cytoplasmic domain 內之二個 α -helix，LLP-1 和 LLP-2，本身皆具 self-assembly 之能力 (圖 13) 且當這兩個 sequence 之 C 端有氨基酸 deletion 時會嚴重影響 LLP-1 和 LLP-2 本身之 self-assembly 能力 (圖 13)。

我們所觀察到的 MBP/706-856 fusion protein 在 sucrose gradient centrifugation 及 gel filtration 中所形成之 multimer 都要比形成 trimer 或 tetramer 者為大。而目前已知 gp41 oligomerization 是由其 ectodomain 內之近 N 端的 leucine zipper-like motif 和近 TM domain 之 C-terminal α -helix 形成一 six-stranded 之 coiled-coil。其中 leucine zipper motif 為形成中心之一 trimeric coiled-coil，而 C 端之 α -helix 則反向地與 leucine zipper motif 形成一 dimeric 構造，且位於 leucine zipper motif 所形成 trimeric coiled-coil 之 groove 內。此種構造現被認為是 membrane fusion 時，gp41 core 所具有之 fusion-active conformation。而截至目前為止，並沒有文獻報導指出 HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 亦可參與 gp41 之 assembly。

我們的結果與 leucine zipper motif 在 fusogenic conformation 之 trimeric 構造不一致，我們的解釋是 gp41 cytoplasmic domain 與病毒 membrane fusion 和 postbinding 之過程有關。在 gp120 與 CD4 及 CXCR4 或 CCR5 結合而引起 membrane fusion 時會有巨大之 conformation 變化，包括 ectodomain 內之 N 端及 C 端的 α -helix peptide 形成一 fusogenic coiled-coil conformation，可能也會把此種 conformational change 之訊號透過 TM domain 傳至 cytoplasmic domain 而使得原為 native 狀態之 monomeric 或 trimeric 之 cytoplasmic domain 轉變成一 high-ordered multimeric structure。而 Env mutant 缺少 C 端之 cytoplasmic domain 則會妨礙 multimerization 之進行也因而阻礙了由 native 狀態轉變成一具有功能性之 postbinding 構造，而具此種 mutant Env 之病毒則不具感染性。另一可能的原因是 cytoplasmic domain C 端 2/3 區域本身，或與 gp41 ectodomain 可行成一 pore 構造，或可穩定 fusion pore，此種 high-ordered 構造才具有使 viral core 進入 infected 細胞之 cytoplasm 內的功能。故 Env 其 cytoplasmic domain 之 C 端有缺失，或此種 mutant Env 被組裝至 wt Env 所形成之 complex 時可 disrupt 由 wt Env 所形成之 pore 或改變了 pore 之 permeability，因而妨礙了 viral core 之進入細胞。

據我們所知，我們的研究是第一個發現一個病毒之 Env protein cytoplasmic domain 本身具自行組裝成一 high-ordered 構造之能力。此外我們的研究結果

也開啓了了解 cytoplasmic domain 及 LLP sequences 在 postbinding、pore formation 和細胞病變上所扮演角色之結構性功能之大門，而此研究也有助於了解 gp41 在病毒 — 細胞 membrane fusion 過程中之分子機制。目前我們正撰寫研究報告，準備投稿於國際性 peer-reviewed 之病毒研究期刊。

(五) 結論與建議

爲進一步了解 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 間之相互作用，以 mammalian *in vivo* 表達系統來探討此二者間之結合是有其必要的，且目前尚無此二蛋白 *in vivo* 相互作用之報導，而利用 mammal matchmaker 系統是一個很好的選擇方式。此外，探討 gp41 cytoplasmic domain 內那些氨基酸對此二者間之相互作用極爲重要亦是一個可行及重要的課題。此方面之研究或許可發現一新的抗愛滋病毒之標的 (target) 而研發出 novel 的抗愛滋病毒藥物。此外，我們雖用細菌表達系統證明 gp41 cytoplasmic domain 自行表達時具有將 monomeric 之 MBP 轉變成 high-ordered structure 之能力，然在真核 (eucaryotic) 細胞中，gp41 cytoplasmic domain 是否仍具 multimerization 之能力仍不得而知。而對此課題之了解，有助於此 domain 在 gp41 所引發之 membrane fusion 過程中所具功能之分子機制。

(六) 參考文獻

Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 523-527.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature (London)* 365, 666-669.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.

Chen, S. S., Ariel, N., and Huang, A. S. (1988). Membrane anchors of vesicular stomatitis virus: characterization and incorporation into virions. *J Virol* 62, 2552-6.

Chen, S. S.-L., Ferrante, A. A., and Terwilliger, E. F. (1996). Characterization of an envelope mutant of HIV-1 that interferes with viral infectivity. *Virology* 226, 260-268.

Dorfman, T., Mannano, F., Haseltine, W. A., and Grollinger, H. G. (1994). Role of matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 68, 1689-1696.

Dubay, J. W., Robers, S. J., Hahn, B. H., and Hunter, E. (1992). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* 66, 6616-6625.

Earl, P. L., Doms, R. W., and Moss, B. (1990). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 648-652.

Earl, P. L., and Moss, B. (1993). Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 589-594.

Fisher, A. G., Ratner, L., Mitsuya, H., Marselle, L. M., Harper, M. E., Broders, S., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1986). Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science* 233, 655-659.

Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* 70, 341-351.

Freed, E. O., and Martin, M. A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* 69, 1984-1989.

Freed, E. O., Orenstein, D. J., Buckler-White, A. J., and Martin, M. A. (1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* 68, 5311-5320.

Gabuzda, D. H., Lever, A., Terwilliger, E., and Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human

immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 66, 3306-3315.

Helseth, E., Kowalski, M., Gabuzda, D., Olshevsky, U., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1990). Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J. Virol.* 64, 2416-2420.

Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W. C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237, 1351-1355.

Lee, S.-J., Hu, W., Fisher, A. G., Looney, D. J., Kao, V. F., Mitsuya, H., Ratner, L., and Wong-Staal, F. (1989). Role of the carboxy-terminal portion of the HIV-1 transmembrane protein in viral transmission and cytopathogenicity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5, 441-449.

Lodge, R., Göttlinger, H. G., Gabuzda, D., Cohen, E. A., and Lemay, G. (1994). The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* 68, 3824-3830.
Mannano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A., and Göttlinger, H. G. (1995). Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* 69, 3824-3830.

Sperman, P., Wang, J.-J., Heyden, N. Y., and Ratner, L. (1994). Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J. Virol.* 68, 3232-3242.

Srinivas, S. K., Srinivas, R. V., Anantharamaiah, G. M., Compans, R. W., and Segrest, J. P. (1993). Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 22895-22899.
Tan, K., Liu, J.-H., Wang, J.-H., Shen, S., and Lu, M. (1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12303-12308.

Tencza, S. B., Miller, M. A., Islam, K., Mietzner, T. A., and Montelaro, R. C. (1995). Effect of amino acid substitutions on calmodulin binding and cytolytic properties of the LLP-1 peptide segment of human immunodeficiency virus type 1

transmembrane protein. *J. Virol.* 69, 5199-5202.

Terwilliger, E., Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Willey, D. C. (1997). Atomic structure of the ecdodomain from HIV-1 gp41. *Nature (London)* 387, 426-430.

Yu, X., Yu, Q.-C., Lee, T.-H., and Essex, M. (1992). The C terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J. Virol.*, 5667-5670.

Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.-H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* 66, 4966-4971.

Yu, X., Yuan, X., McLane, M. F., Lee, T.-H., and Essex, M. (1993). Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* 67, 213-221.

Yuan, Y., Yu, X., Lee, T.-H., and Essex, M. (1993). Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J. Virol.* 6387-6394.

(七)圖表

Table 1. Construction of Two-Hybrid Plasmids Based on the Gal4 Promoter System

Plasmids:	Selection Marker:	Catagory:	Inserts:
pGBT9	TRP1	Gal4 DB	env706-856 env760-856 env789-856 gag1-88 gag1-104 gag1-132
pGBT9L	TRP1	Gal4 DB	env706-856 gag1-377
pAS2-1	TRP1	Gal4 DB	env706-856 gag1-132
pGAD424	LEU2	Gal4 AD	env706-856 env760-856 env789-856 gag1-88 gag1-104 gag1-132
pGAD424L	LEU2	Gal4 AD	env706-856 env760-856 env789-856 gag1-377
pGAD GH	LEU2	Gal4 AD	gag3-132 gag3-377

Table 2. Construction of Two-Hybrid Plasmids Based on the LexA Promoter System

Plasmids:	Selection Marker:	Category:	Inserts:
pBHA	TRP1	LexA DB	706-856 gag1-132
pEG202	HIS3	LexA DB	env706-856 gag1-132 gag1-377
pJG4-5	TRP1	B42 acid patch trx activation domain	gag1-88 gag1-104 gag1-132 gag1-377
pSH18-34	URA3	reporter plasmid 8 LexA operators in front of lacZ gene	
pGAD424	LEU2	Gal4 AD	env706-856 env760-856 env789-856 gag1-88 gag1-104 gag1-132
pGAD424L	LEU2	Gal4 AD	env706-856 env760-856 env789-856 gag1-377
pGAD GH	LEU2	Gal4 AD	gag3-132 gag3-377

Table 3. The yeast strains and plasmids that have been tested.

Yeast strain	1° plasmid	2° plasmid
HF7c	pAS2-1-env706-855	pGAD424-gag1-132
HF7c	pAS2-1-gag1-132	pGAD424-env706-855
Y190	pGBT9-env706-855	pGAD424-gag1-132 pGAD424-gag1-104 pGAD424-gag1-88
Y190	pGBT9-env760-855	pGAD424-gag1-132 pGAD424-gag1-104 pGAD424-gag1-88
Y190	pGBT9-env789-855	pGAD424-gag1-132 pGAD424-gag1-104 pGAD424-gag1-88
Y190	pGBT9-gag1-104	pGAD424-env706-855 pGAD424-env760-855 pGAD424-env789-855
Y190	pGBT9-gag1-88	pGAD424-env706-855 pGAD424-env760-855 pGAD424-env789-855
Y190	pGBT9L-env706-789	pGAD424L-gag1-377
Y190	pGBT9L-gag1-377	pGAD424L-env706-855
L40	pBHA-env706-855	pGAD-GH-gag3-132 pGAD424L-gag3-377

Table 4. Binding of recombinant proteins encompassing the gp41 cytoplasmic domain to MA by ELISA.

Fusion protein containing	Relative binding Absorbance at 492 nm
PBS only	0.070
G-tag	0.071
G-tag/gp41 CD(706-855)	0.160
G-tag/gp41 CD(760-855)	0.133
G-tag/gp41 CD(789-855)	0.134

Table 5. Binding of gp41 cytoplasmic domain fragments to MA.

Fusion protein containing	Relative binding to MA Absorbance at 492 nm
PBS only	0.184
G-tag	0.189
G-tag/gp41 CD(706-855)	0.617
G-tag/gp41 CD(760-855)	0.480
G-tag/gp41 CD(789-855)	0.478
G-tag/gp41 CD(804-855)	0.924
G-tag/gp41 CD(815-855)	0.695
G-tag/gp41 CD(706-752)	0.183
G-tag/gp41 CD(706-775)	1.034
G-tag/gp41 CD(706-795)	0.824
G-tag/gp41 CD(706-812)	0.467
G-tag/gp41 CD(706-844)	0.526
G-tag/gp41 CD(789-855)	0.478

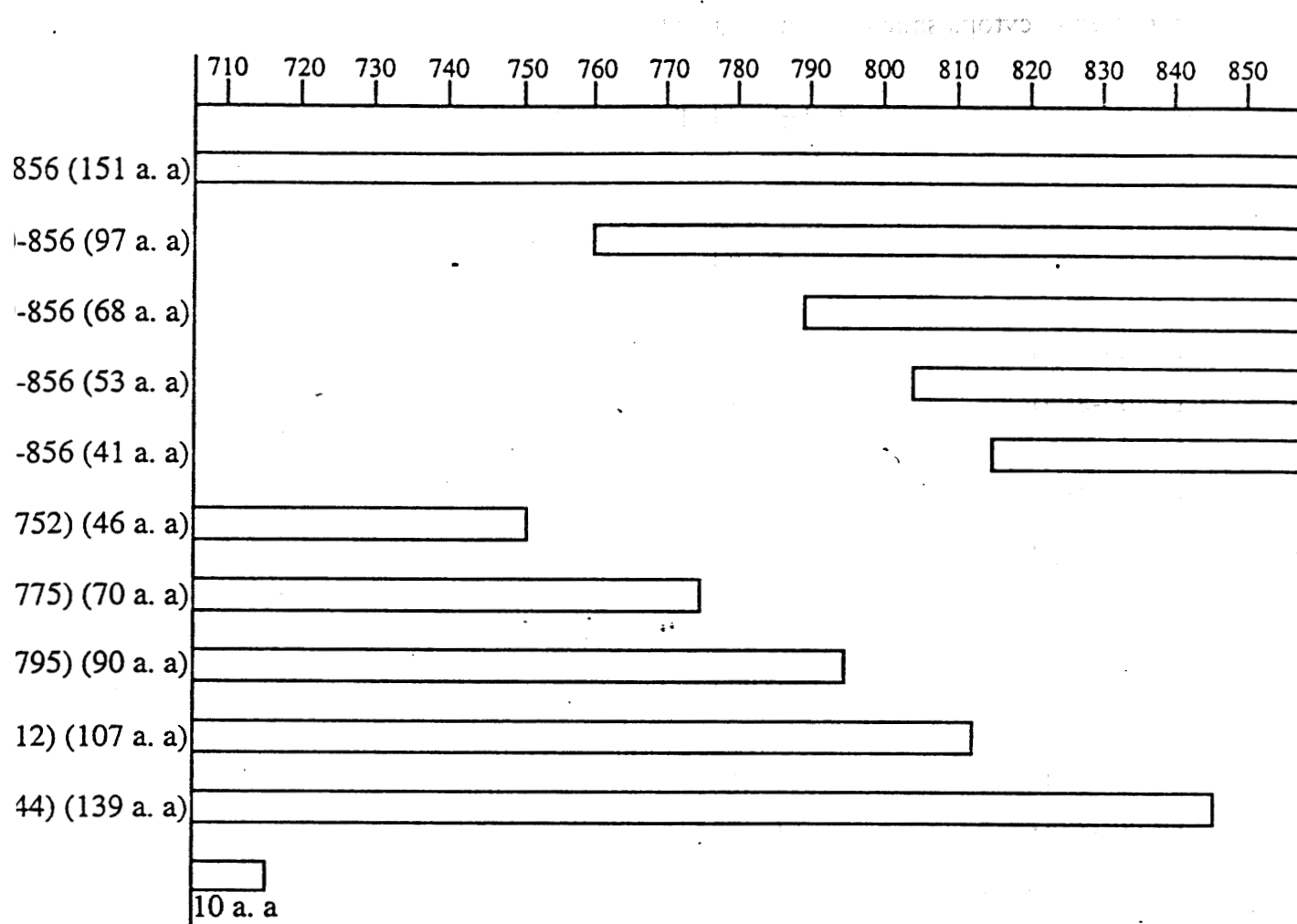


Fig. 1. A representation of proteins encoded by pET32a(G-tag)-gp41 cytoplasmic domain plasmids.

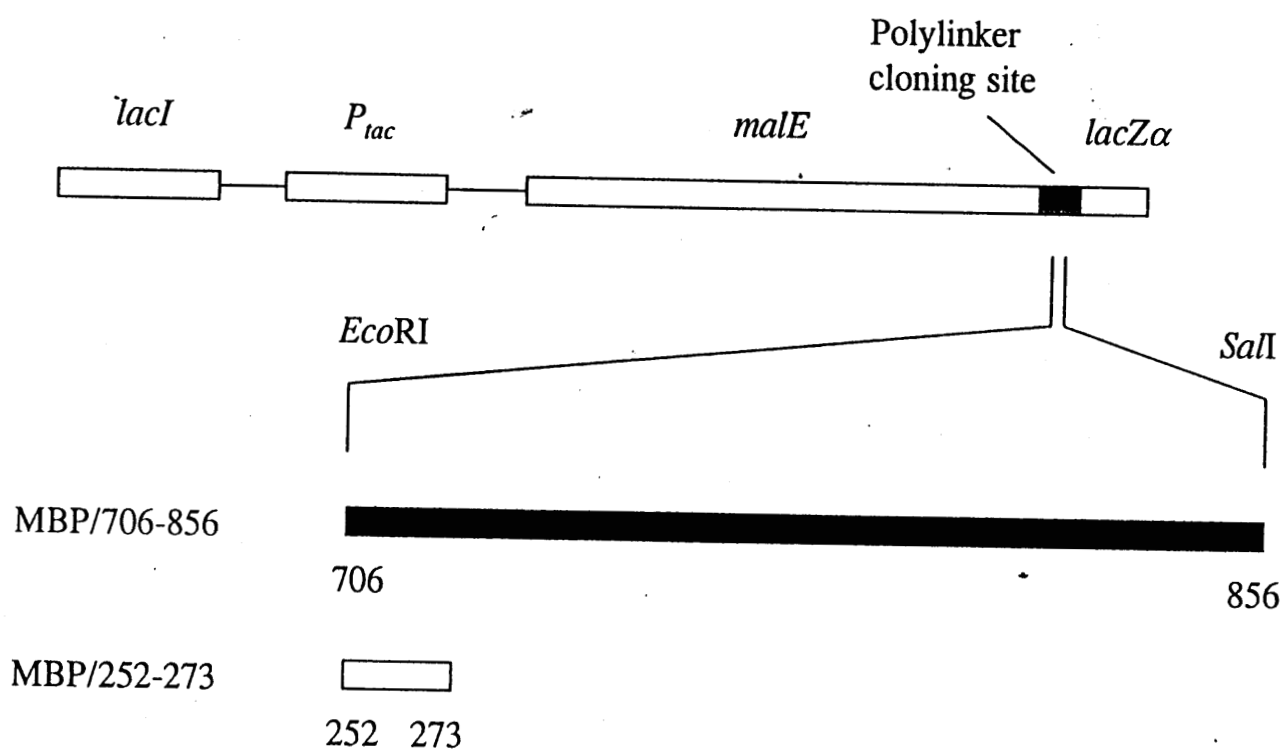


FIG.2A Construction of pMal-based *env* expression plasmids. The coding sequences of the entire cytoplasmic domain from residues 706 to 856 and of 252 to 273 of gp120 were cloned by PCR and inserted into the pMal vector using the *EcoRI* and *SalI* cloning sites in the polylinker cloning region.

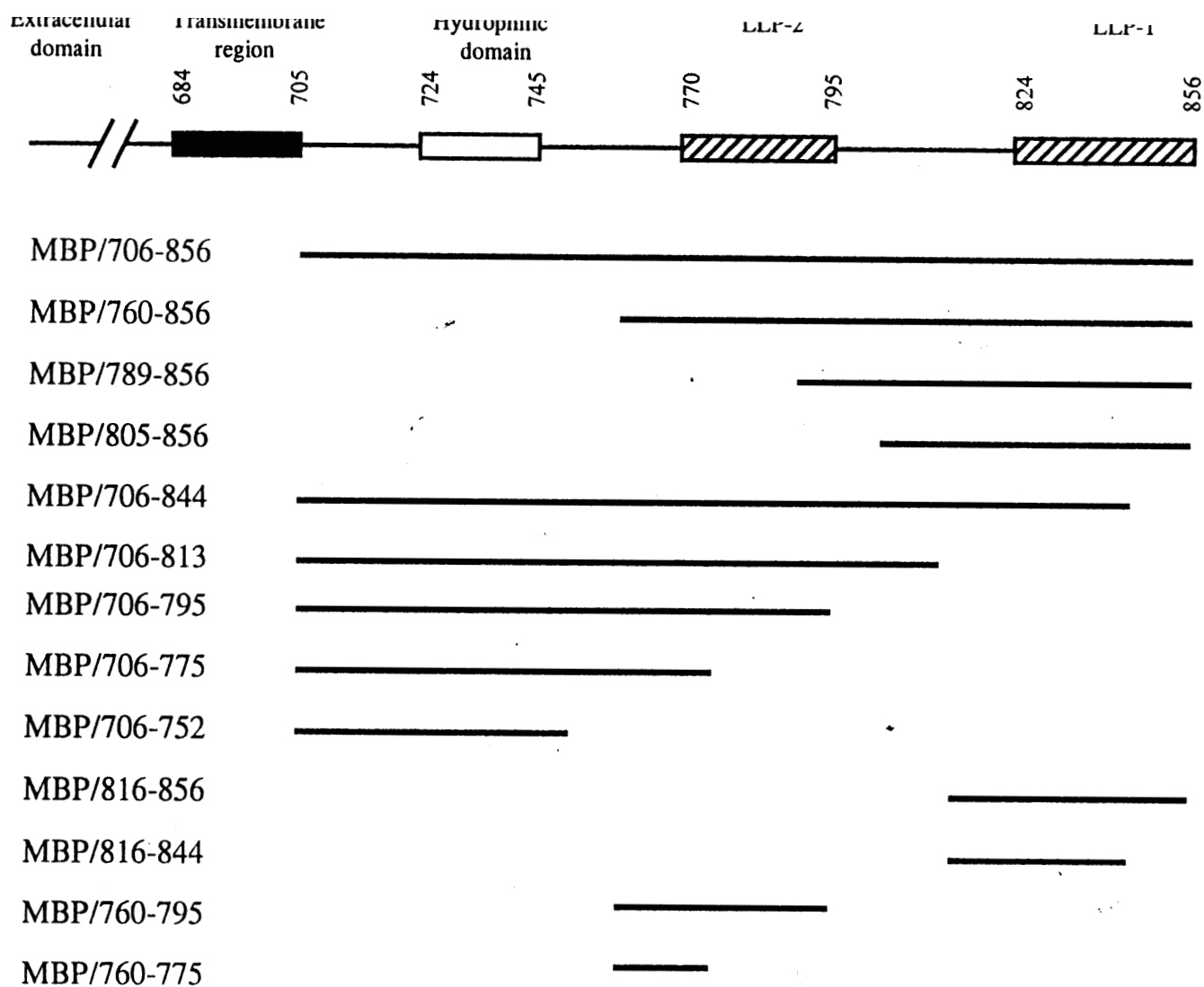


FIG. 2B. Construction of pMal-based plasmids that encoded different regions of the cytoplasmic domains. DNA fragments encompassed by the *Eco*RI and *Sal*I linkers corresponding to different regions of the cytoplasmic domain were obtained by PCR using specific primers and templates as described in Table 1 and Table 2, and cloned into the pMal vector.

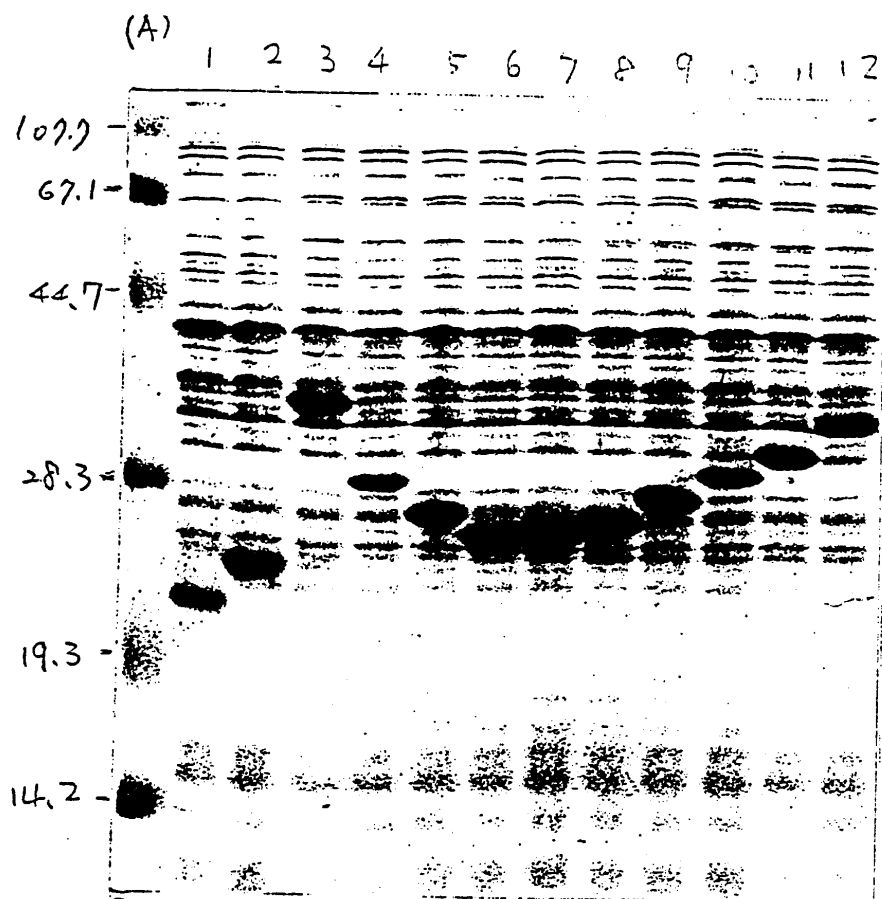
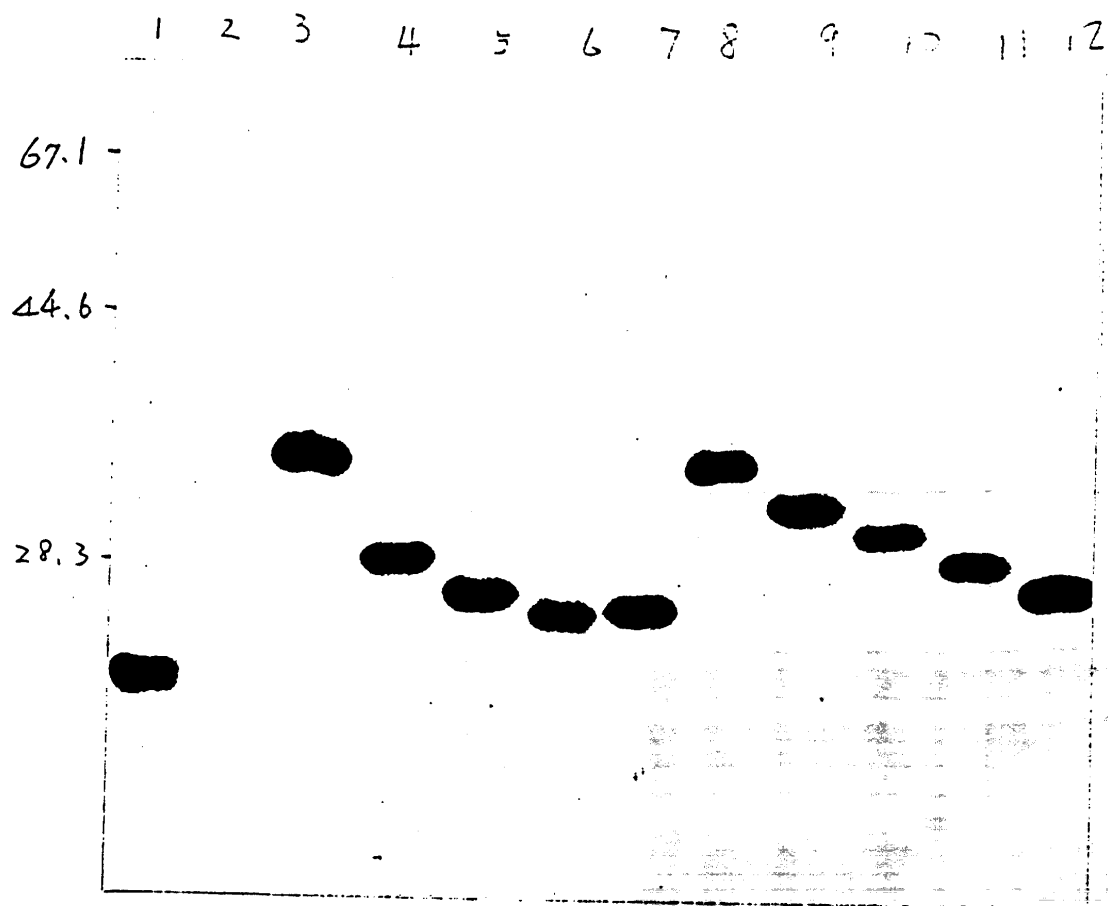


fig. 3A. env protein expression

(a) Coomassie blue staining.

- | | |
|----|---------------------------|
| #1 | pET32a. |
| 2 | pET32a-g-tag |
| 3 | pET32a-g-tag/env 706-856 |
| 4 | " / env 760-856 |
| 5 | " / env 789-856 |
| 6 | " / env 804-856 |
| 7 | " / env 815-856 |
| 8 | " / env 706-856 (TM 752) |
| 9 | " / env 706-856 (TM 775) |
| 10 | " / env 706-856 (TM 795) |
| 11 | " / env 706-856 (TM 815) |
| 12 | " / env 706-856 (TM 844). |

B



C



說明見後頁

fig 3B and 3C (continued)

(bxc) Western blot.

(b) ~~detect~~ Detect by rabbit α G (COOH)

(c) Detect by human α HIV.

#1. pET32a

#2 pET32a-g-tag

3	pET32a-g-tag	/ env 706-856
4	"	/ env 760-856
5	"	/ env 789-856
6	"	/ env 804-856
7	"	/ env 815-856
8	"	/ env 706-856 (TM 844)
9	"	/ env 706-856 (TM 812)
10	"	/ env 706-856 (TM 795)
11	"	/ env 706-856 (TM 775)
12	"	/ env env 706-856 (TM 752)

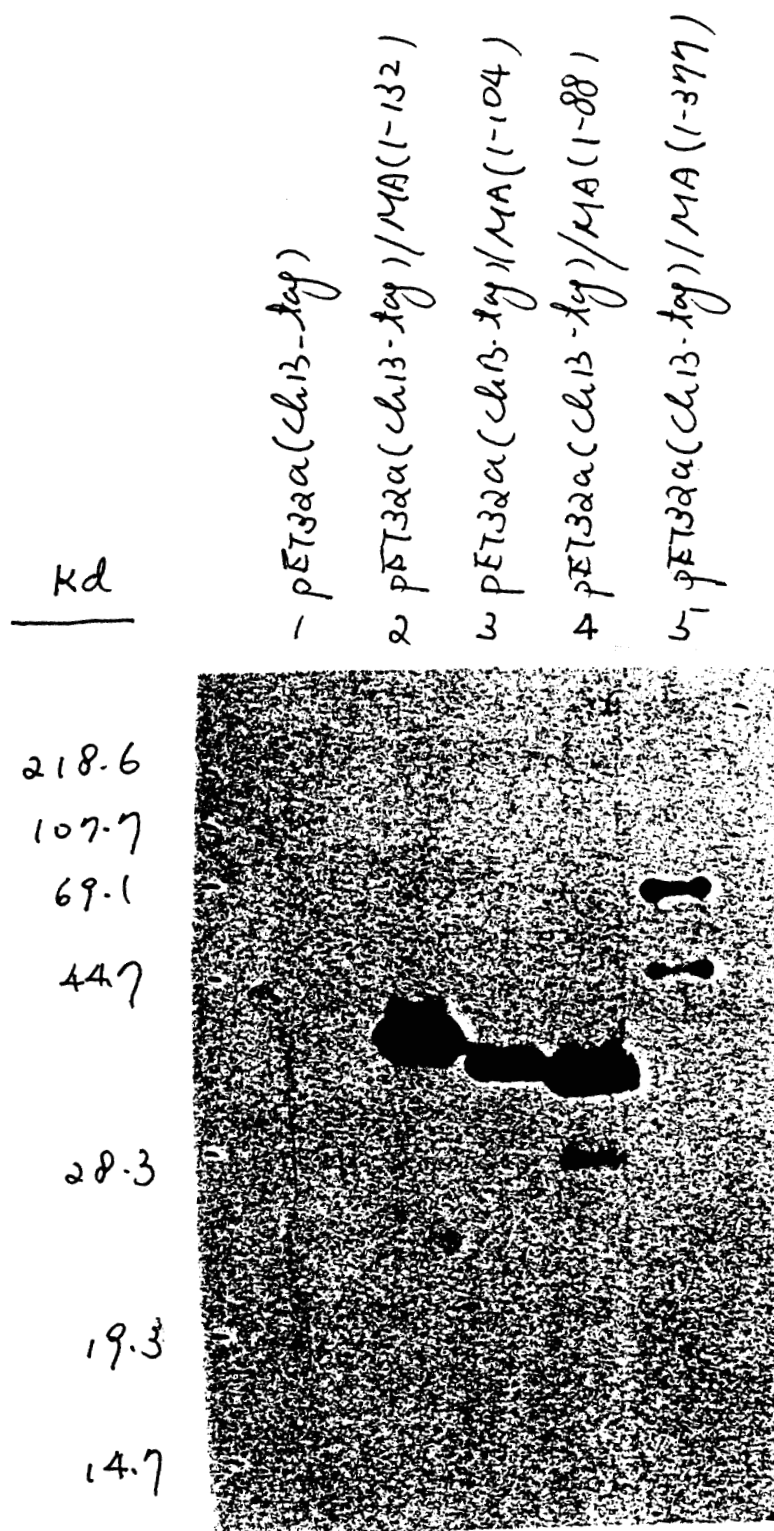


Fig. 4. Expression of recombinant MA proteins.

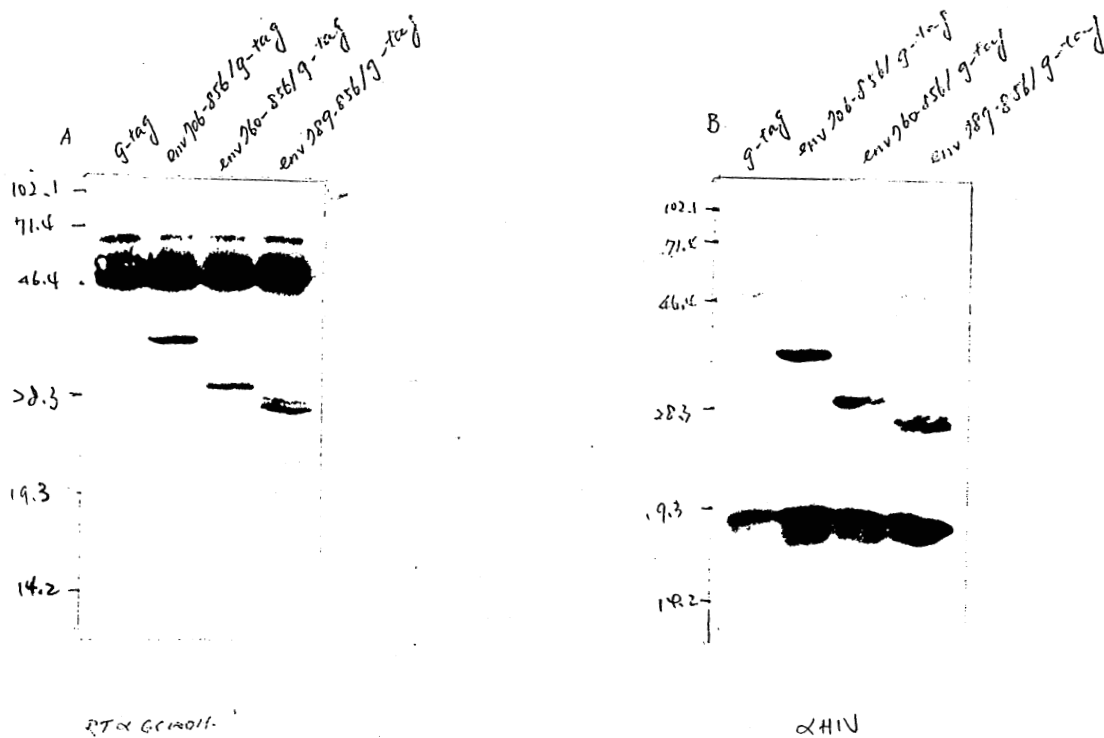


Fig 5. Immunoprecipitation. Protein-A-Sepharose is incubated with rabbit anti P17 antibody >2hr, wash by 1x PBS, and then incubated with purified MA >2hr, and then washed by 1x PBS. The beads that combined with MA protein were incubated bacteria lysate that contain the induced Env protein >2hr. Then wash by 1x PBS, add 2x Laemmli buf. and boil in water bath. The eluted sample is detected by Western blot.

human anti HIV antibody

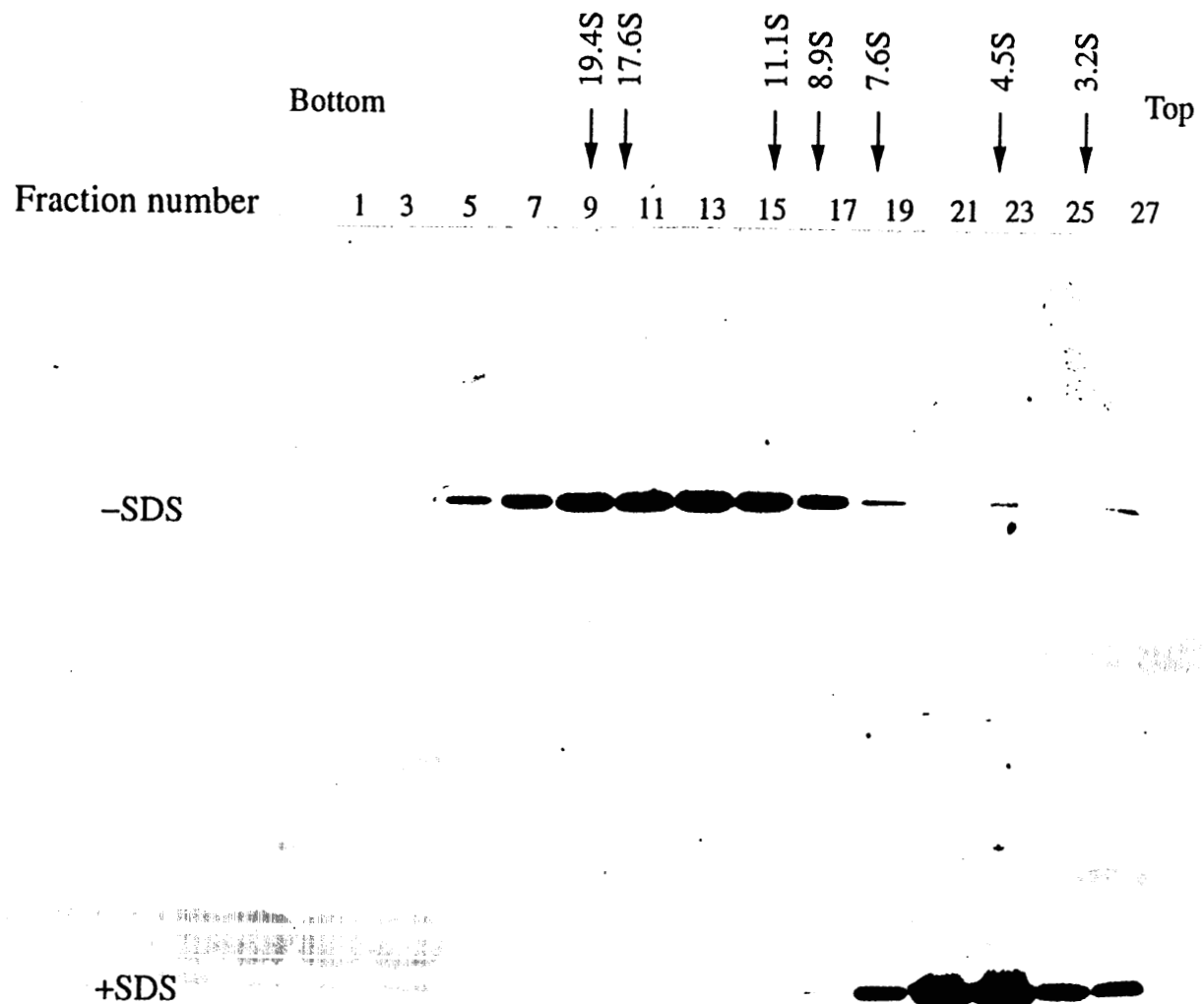


FIG. 6. Sucrose gradient analysis of MBP/706-856. Cell extracts which contained MBP/706-856 were analyzed by 20% to 45% sucrose gradient centrifugation followed by Western blotting using anti-HIV. The top panels show that the samples were directly loaded onto the gradient and the bottom panels indicate that the samples were first treated with a final concentration of 1% SDS at 4°C for 30 min prior to centrifugation. The following standard globular proteins with sedimentation coefficients shown in parentheses were sedimented in parallel: thyroglobulin

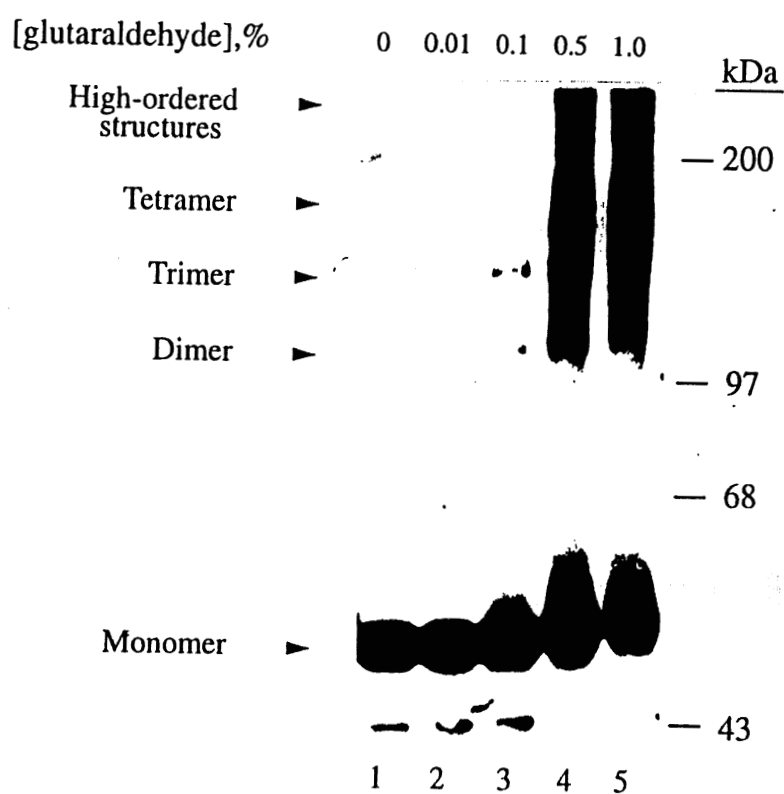


FIG. 8. Cross-linking of the MBP/706-856 fusion protein. Purified MBP/706-856 (1.3 μ g) was reacted with different concentrations of glutaraldehyde as indicated and then analyzed by Western blotting with anti-MBP. The arrowheads indicate the migration of different forms of

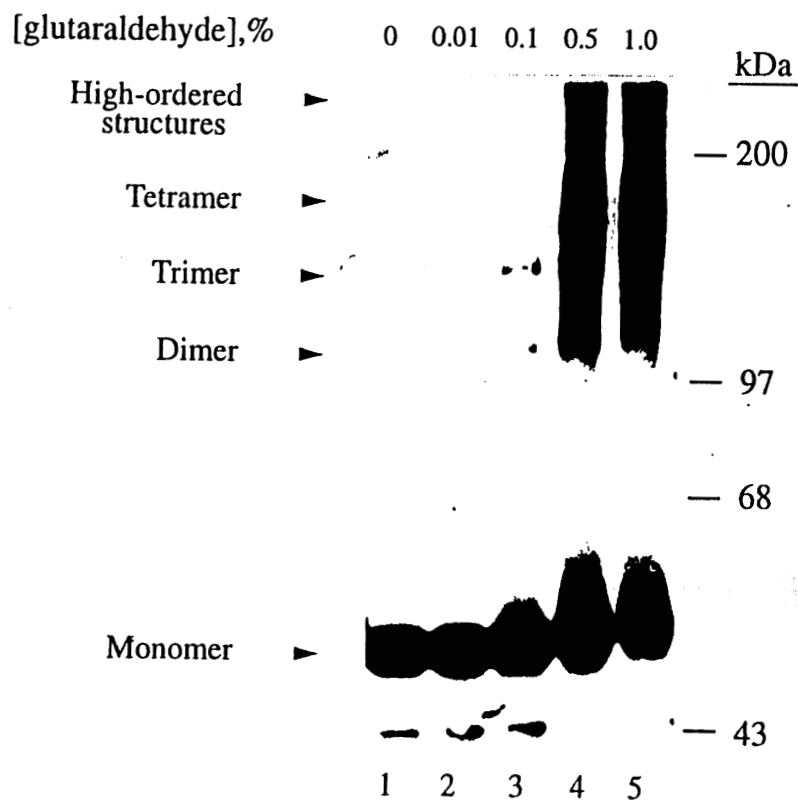


FIG. 8. Cross-linking of the MBP/706-856 fusion protein. Purified MBP/706-856 (1.3 μ g) was reacted with different concentrations of glutaraldehyde as indicated and then analyzed by Western blotting with anti-MBP. The arrowheads indicate the migration of different forms of

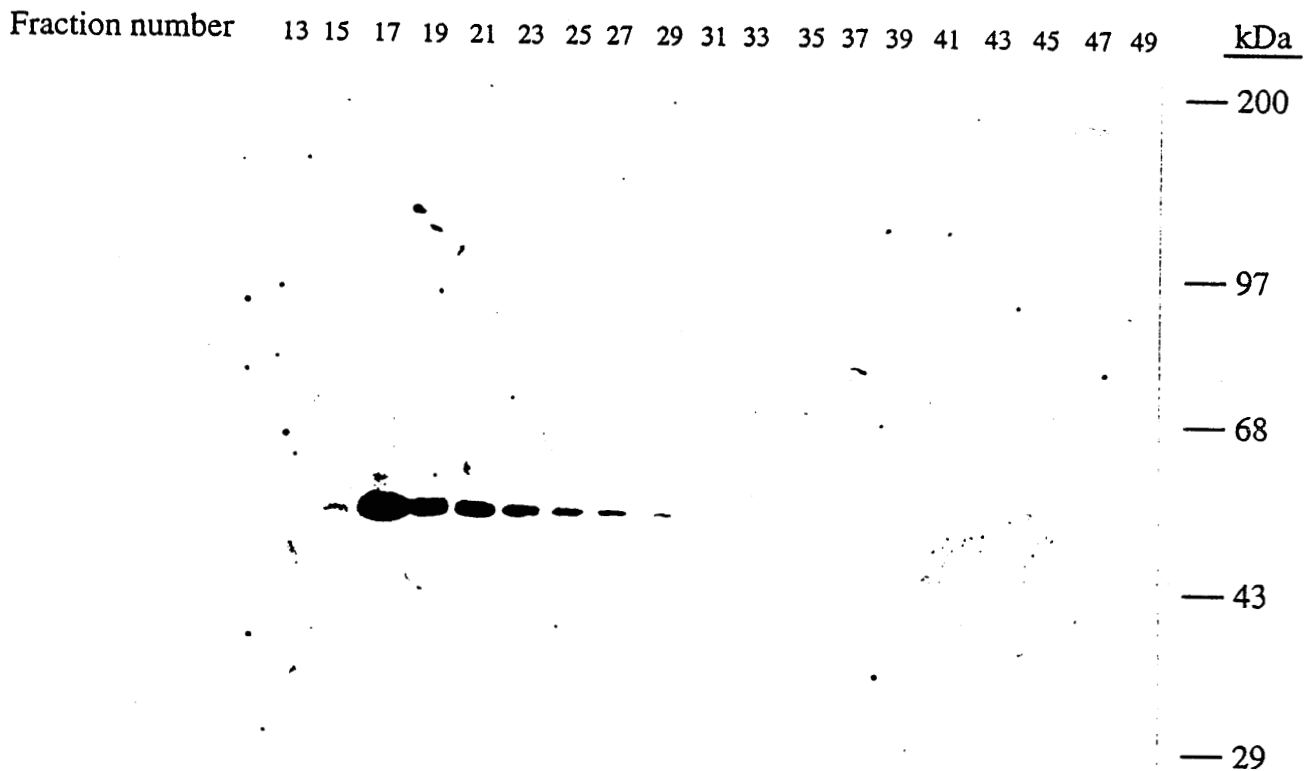
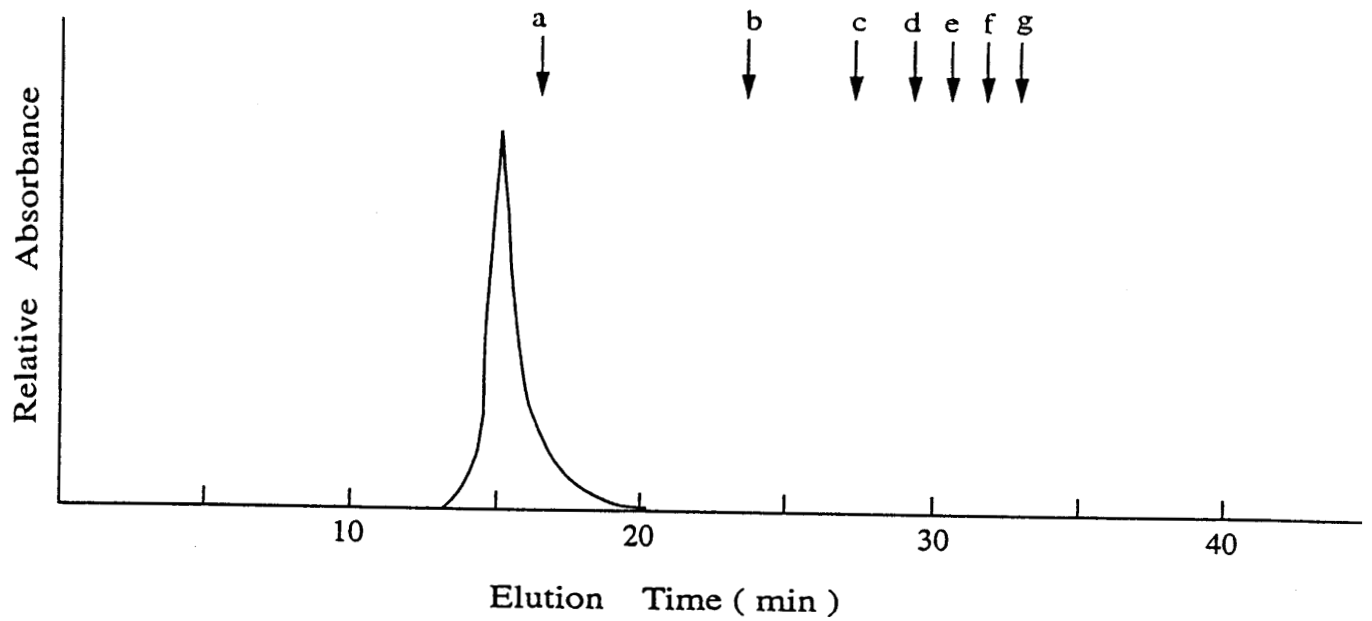


FIG. 9. Gel filtration chromatography of MBP/706-856 using Superose 6 size exclusion column. Purified MBP/706-856 was injected into a Superose 6 column and the protein elution pattern as measured by UV absorption at 280 nm is shown (top panel). The elution peaks of the molecular weight standards are marked on the top of the elution profile with arrows. These molecular weight markers are: (a) blue dextran (2,000 kDa); (b) thyroglobulin (670 kDa); (c) ferritin (440 kDa); (d) catalase (232 kDa); (e) aldolase (158 kDa); (f) albumin (67 kDa); and (g) ovalbumin (43 kDa). Aliquots in the fractions as indicated were analyzed by Western blotting using anti-HIV (bottom panel).

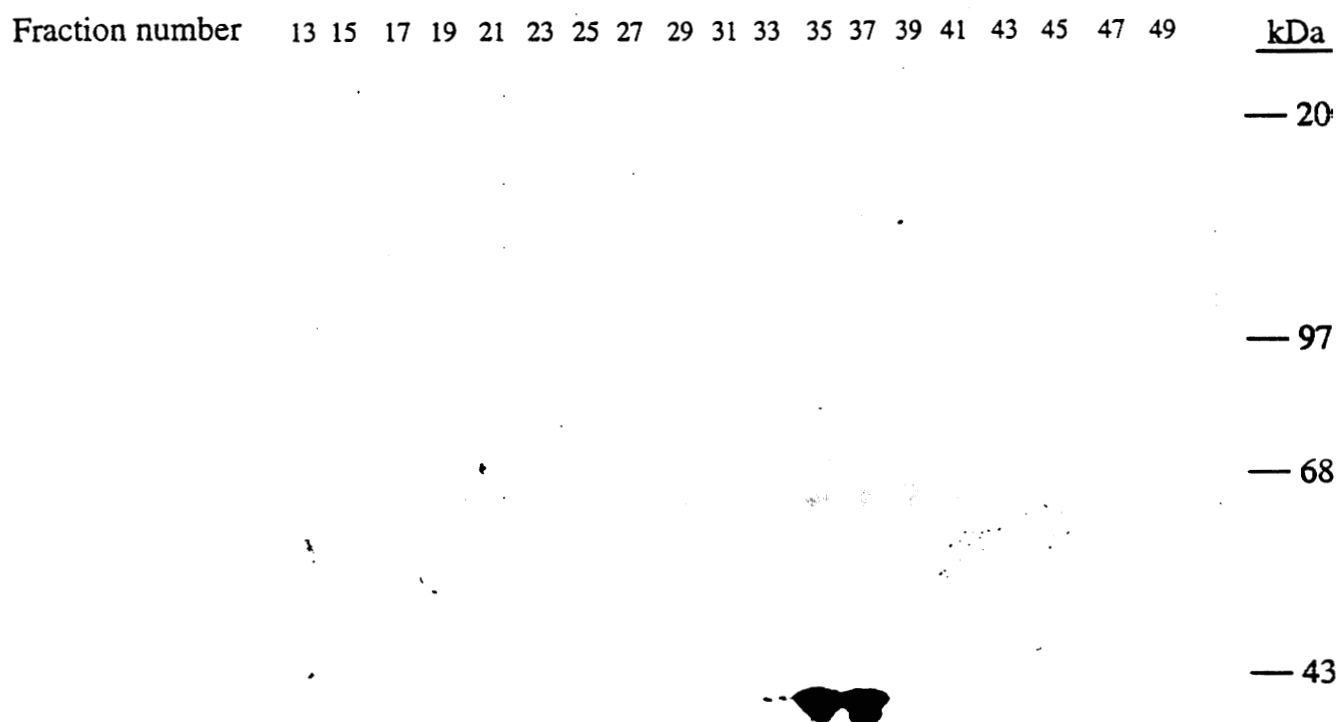
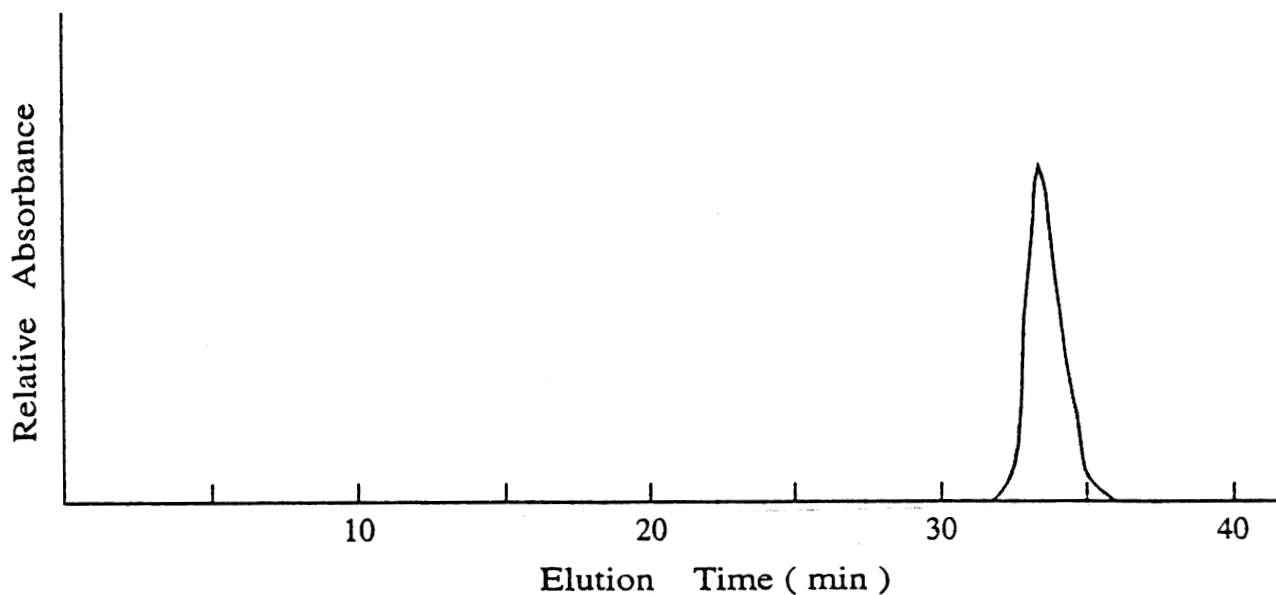


FIG. 10. Gel filtration of MBP/252-273. Purified MBP/252-273 was analyzed by Superose column (top panel) and the result of Western blotting using Chessie 13 is also shown (bottom panel).

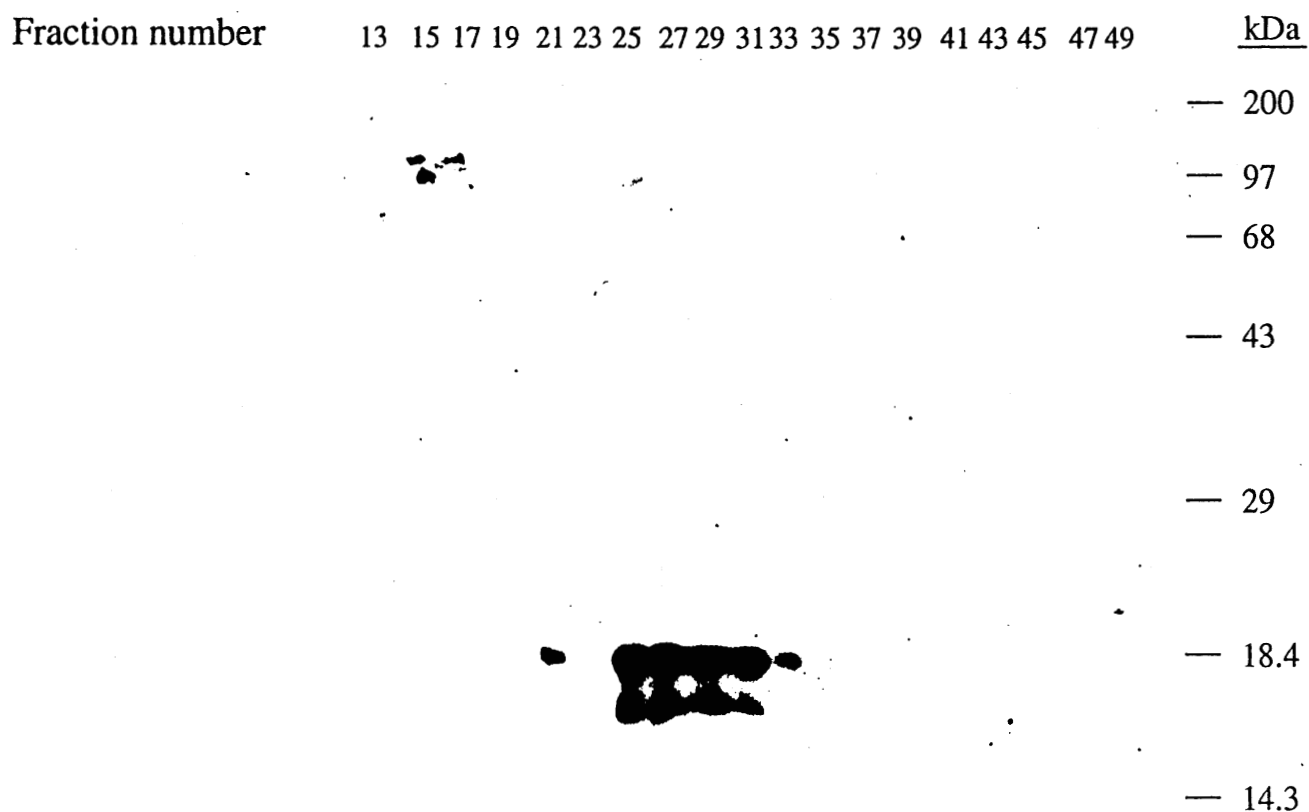


FIG. 11. Gel filtration of the cytoplasmic domain expressed from the pET21(a) vector. The fusion protein expressed from pET21(a) was purified by a Talon affinity column and then fractionated by a Superose 6 column. Aliquots of samples were analyzed by Western blotting using anti-HIV.

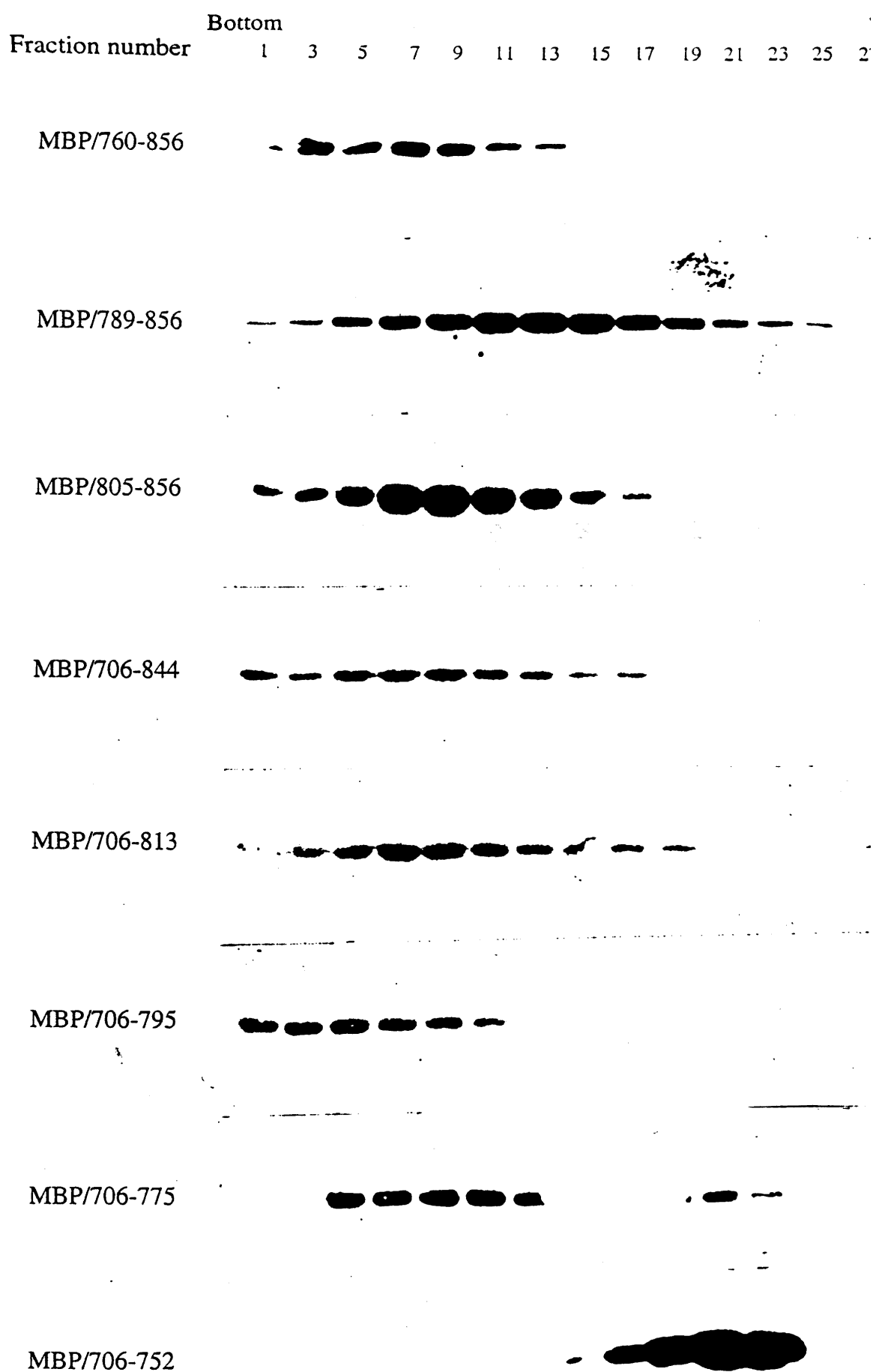


Fig. 12. Characterization of MBP fusion proteins containing different regions of the cytoplasmic domain by sucrose gradient analysis. Aliquots (0.5-ml) of crude cell extracts containing fusion proteins as indicated were subjected to 20% to 45% sucrose gradient centrifugation followed by Western blotting analysis. Fusion proteins containing residues 760-856, 789-856, 805-856, 706-844, 706-813, and 706-795 were analyzed by anti-HIV whereas fusion proteins containing residues 706-775 and 706-752 were analyzed by MAb Chemo-9.

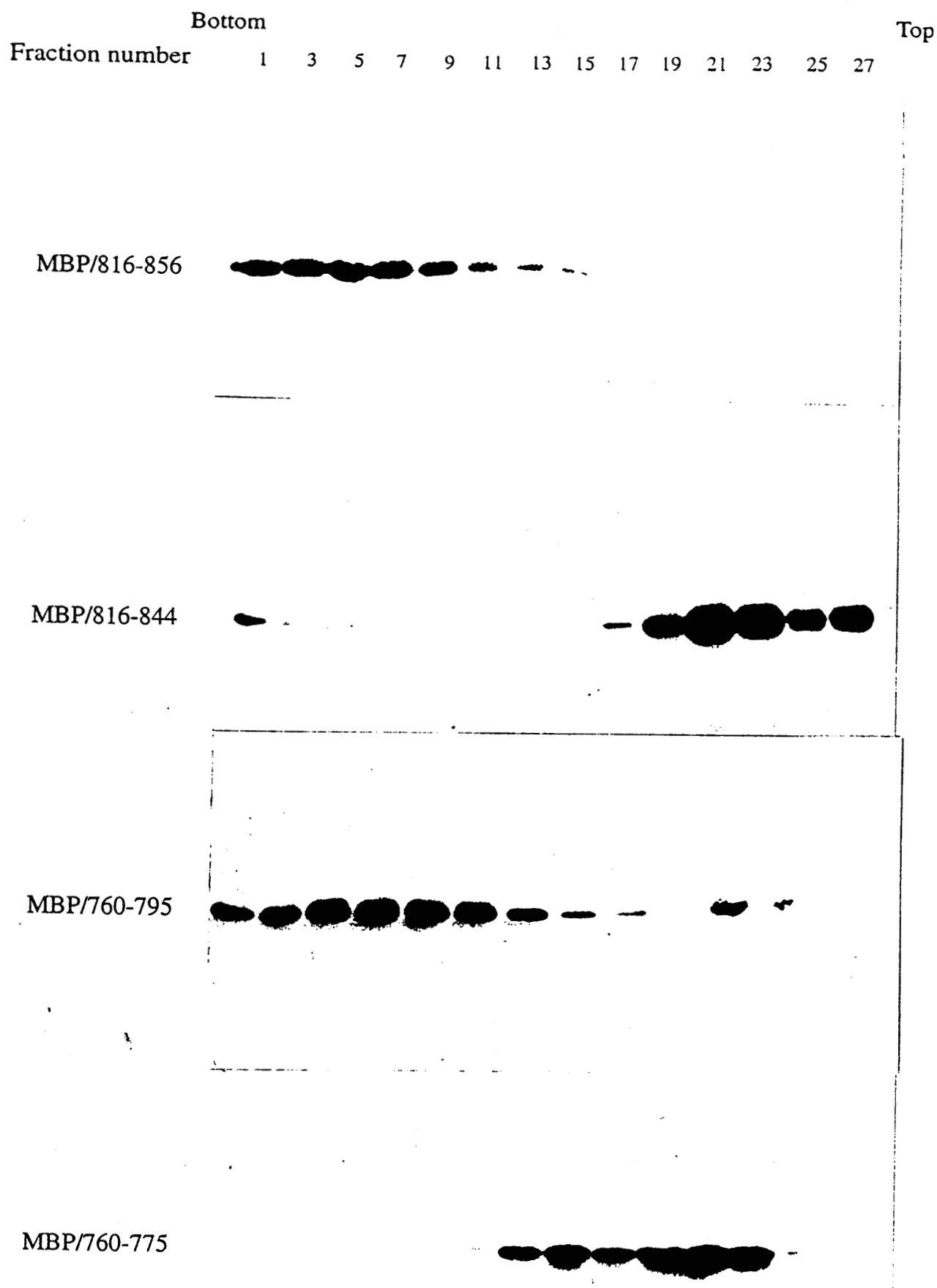


FIG. 13. Analysis of MBP fusion proteins containing LLP sequences by sucrose gradient centrifugation. Fusion proteins containing the sequences as indicated were sedimented through sucrose gradient centrifugation. Fusion proteins in the fractions as indicated were analyzed by Western blotting using anti-HIV for detection of the 816-856 fusion protein and anti-MBP for detection of 816-844, 760-795 and 760-775 fusion proteins.

八十八 ~ 八十九年度計畫著作一覽表

計畫名稱：HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 之功能與病毒蛋白間作用之探討

主持人：陳 士 隆 DOH87-TD-1035 和
計畫編號：DOH88-TD- 1085

列出貴計畫於本年度中所有計畫產出於下表，包含已發表或已被接受發表之文獻、已取得或被接受之專利、擬投稿之手稿 (manuscript) 以及專著等。「計畫產出名稱」欄位請依「臺灣醫誌」參考文獻方式撰寫；「產出形式」欄位則填寫該產出為期刊、專利、手稿或專著等，舉例如下：

序號	計 畫 產 出 名 稱	產出形式	SCI*
1	Steve SL Chen, Judy YP Liang, SF Lee, and CC Huang. Multimerization of the Cytoplasmic Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Glycoprotein gp41. J. Virol. (manuscript in preparation)	期刊	✓
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

* SCI: Science Citation Index，若發表之期刊為 SCI 所包含者，請打「✓」。

八十七 ~ 八十八年度計畫重要研究成果

計畫名稱：HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 之功能與病毒蛋白間作用之探討

DOH87-TD-1035 and

主持人：陳士隆

計畫編號：DOH88-TD-1085

1. 計畫之新發現或新發明

我們以 *E. coli* 表達系統來表達 MA 和 gp41 cytoplasmic domain 之不同區域，再以免疫共同沉降法 (immuno-coprecipitation) 發現含 gp41 cytoplasmic domain 之 C 端部分之蛋白 (如含氨基酸 789 至 856) 可與 MA 共同沉降，我們再以 ELISA 發現含氨基酸 706 至 775 之 fusion protein 可與 MA 結合而含 706 至 752 之 fusion protein 則無法和 MA 結合，此結果顯示氨基酸 752 至 775 在 gp41 cytoplasmic domain 和 MA 之結合中至為重要。此外我們發現 HIV-1 gp41 之 cytoplasmic domain 具有自己組成 oligomer 之能力，且其內之 LLP-1 和 LLP-2 在 cytoplasmic domain 之 oligomerization 上具有極重要之作用。據我們所知此為第一個研究發現一病毒 Env 蛋白之細胞質內區域具有 oligomerization 之能力。我們的研究在了解 HIV-1 gp41-mediated viral entry 及 membrane fusion 後之過程之分子機制提供了一重要的看法。

依據目前的結果，進一步以 mammalian *in vivo* interaction assay 方法來探討 gp41 cytoplasmic domain 內那些區域或氨基酸是 cytoplasmic domain-MA 或 cytoplasmic domain 與 cytoplasmic domain 間作用所不可或缺的有其必要性。這些研究之達成有助於以 gp41 cytoplasmic domain 為一抗 HIV 標的 (target) 之探討及抗愛滋病毒方法之研發。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

對 HIV-1 gp41 細胞質內區域所扮演之構造，功能之探討有助於以此區域為標的之抗病毒藥物治療和基因療法之研發。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

基礎研究雖不若臨床研究可在較短的時間內得到結果和看出成效，然基礎研究之影響是深遠和全面性的，在國家科技競爭力之提升上是極為重要的。愛滋病研究在全世界上受到極大之重視，且是不分國界的，有效的預防和治療措施在疾病的控制上是迫切的和急需的，而愛滋病基礎醫學的研究能更清楚了解此病毒各蛋白在病毒複製過程所具之功能，是愛滋病預防和治療之利器，故建議政府應制定政策鼓勵和推動這方面的研究。

八十七 ~ 八十八年度科技計畫重要研究成果產出統計表

計畫名稱：HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 之功能與病毒蛋白間作用之探討

主持人：陳士隆

計畫編號：DOH87-TD-1035 和 DOH88-TD-1085

(係指執行八十八年度計畫之所有研究產出成果)

科技論文篇數			技術移轉			技術報告		
發表地點	國內	國外	類型	經費	項數	篇		
類型						技術創新		
期刊論文	篇	撰寫中 1 篇	技術輸入	千元	項	技術服務		
研討會 論文	篇	篇	技術輸出	千元	項	專利權 (核准)	國內	項
							國外	項
專著	篇	篇	技術擴散	千元	項	著作權 (核准)	國內	項
							國外	項

[註]：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部分一般包括引言、方法、結果及討論，並且一定有參考文獻部分，未在學術性期刊上刊登之文章(研究報告等)與博士或碩士論文，則不包括在內。

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者。

專著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品。

技術報告：指因從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告並未公開發表者。

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術移轉包括下列三類：
一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散。

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者。

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力的應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方式包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種。

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉(政府移轉民間)。

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者。

參與八十七 ~ 八十八年度計畫研究人力之職級分析表

計畫名稱：HIV-1 gp41 cytoplasmic domain 之功能與病毒蛋白間作用之探討

主 持 人：陳 士 隆 計畫編號：DOH88-TD- 1085

職級	所含職級類別	參與人次
第一級	研究員、教授、主治醫師	人
第二級	副研究員、副教授、總醫師	1 人
第三級	助理研究員、講師、住院醫師	人
第四級	研究助理、助教、實習醫師	3 人
第五級	技術人員	人
第六級	支援人員	人
合 計		4 人

〔註〕

第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。

第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者。

第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士或學士滿三年以上之研究經驗者。

第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初（國）中、高中（職）、大專以上畢業者或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、祕書、事務人員及維修、電機人員等。