

A Novel PA-X Protein Translated from Influenza A Virus Segment 3

Ilseob Lee^{1,2}, Jin Il Kim^{1,2} and Man-Seong Park^{1,2*}

¹Department of Microbiology, ²Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, Korea

The pathogenicity of influenza A viruses is a multigenic trait, which is orchestrated by the global networks between eight viral genomic constituents and their cellular interacting partners. A recent report provided information on the finding of a new PA ribosomal frameshifting product, the PA-X protein, in the influenza A virus segment 3, and an endonuclease property was suggested for a possible role of the PA-X protein. In cultured cells, viral growth was not affected by the PA-X protein expression. However, the reduced pathogenicity of mice appeared to be closely associated with the PA-X protein expression. It was also revealed that the PA-X protein was able to modulate host gene expression. Considered together, the PA-X protein can be a cellular signaling modulator and subsequently control viral pathogenicity. By reviewing recent publications, we present new insights in the contribution of the PA-X protein to the cellular signaling network and the resultant viral pathogenicity.

Key Words: Influenza, Endonuclease activity, Pathogenicity, PA-X, Ribosomal frameshift

서 론

A형 인플루엔자 바이러스는 호흡기 질환을 유발하는 주요 원인체 중의 하나로 사람을 포함한 다양한 동물에 감염되어 사회적·경제적 문제를 일으키고 있다 (1). 매년 발생하는 계절성 인플루엔자바이러스의 유행(seasonal epidemics)에 의해 전세계적으로 약 25만~50만 명의 사망자가 발생하고 있으며 (2), 불규칙하게 발생하는 인플루엔자바이러스 대유행(pandemic)은 계절성 유행보다 더욱 심각한 공중보건학적 문제를 발생시키고 있다. 일례로, 지난 20세기에는 3번의 인플루엔자바이러스 대유행이 발생하였는데, 1918년에 발생한 인플루엔자바이러스 대유행 시 약 5천만 명, 1957년에 발생한 인플루엔자바이

러스 대유행 시 약 100만 명, 1968년 발생한 인플루엔자 바이러스 대유행 때는 약 100만 명의 사망자가 발생한 것으로 알려져 있다 (3). 최근에는 사람이 고병원성 조류 인플루엔자바이러스에 감염되어 사망하는 사례가 지속적으로 보고되고 있으며, 감염환자 수는 많지 않지만 약 59%의 높은 치사율을 보이고 있어 현 인류에게 잠재적인 위협이 되고 있다 (4). 이러한 인플루엔자바이러스의 병원성을 조절하는 인자에 대한 연구는 지속적으로 이루어져 왔으나, 인플루엔자바이러스의 병원성은 인플루엔자 바이러스를 구성하는 모든 유전자에 영향을 받는 복합적인 양상(polygenic trait)을 나타낸다. 그러므로 인플루엔자 바이러스가 발현하는 각각의 단백질이 병원성에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 중요한 의미를 갖는다. A형 인플루엔자바이러스는 8개의 단일 음성가닥 RNA (single-

Received: November 15, 2012/ Revised: November 19, 2012/ Accepted: November 22, 2012

*Corresponding author: Man-Seong Park, Ph.D. Department of Microbiology, Center for Medical Science Research, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon, Gangwon-do, 200-702, Korea.

Phone: +82-33-248-2632, Fax: +82-33-252-2843, e-mail: manseong.park@gmail.com

**This study was supported by a grant from the Korea healthcare technology R&D project of the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grants No. A103001).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

stranded, negative-sense RNA)가 분절되어(segmented) 있는 유전체로 구성되어 있다. 일반적으로 8개의 RNA 분절 유전체는 10개의 단백질(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NS2)을 발현하는 것으로 알려져 있으며 (5), 모든 A형 인플루엔자바이러스가 발현하는 것은 아니지만, 지난 2001년과 2009년 PB1-F2와 PB1-N40이라는 단백질이 PB1 유전자에서 발현된다는 사실이 밝혀져, 일부 A형 인플루엔자바이러스는 8개의 유전자에서 12개의 단백질을 발현하여 증식한다 (6, 7). 그러나 지난 7월, A형 인플루엔자바이러스에 의해 발현되는 새로운 13번째 단백질인 PA-X 단백질이 밝혀졌고, 이 PA-X 단백질은 인플루엔자바이러스의 병원성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (8). 이에 본 논문에서는 처음으로 PA-X 단백질의 발현기전과 이 단백질이 병원성에 미치는 영향을 분석한 논문 (8)을 소개하고자 한다.

1. PA 유전자에서 발현되는 PA-X 단백질

PA-X 단백질은 PA 유전자로부터 발현되는 또 다른 단백질로, 일종의 부속 단백질이다. 인플루엔자바이러스의 한 유전자에서 두 개 이상의 단백질이 발현되는 현상은 이미 알려져 있다. A형 인플루엔자바이러스의 경우 M (Matrix) 유전자와 NS (Non structural) 유전자에서 이러한 현상이 나타나는데, 유전자 이어맞춤(splicing)에 의해 M 유전자는 M1과 M2 단백질을 발현하고 (9, 10), NS 유전자는 NS1과 NS2 단백질을 발현한다(Fig. 1A) (11). 또한 PB1-F2 단백질과 PB1-N40 단백질의 경우 PB1 유전자로부터 발현되는데, PB1 단백질을 코딩하는 유전자의 다른 번역틀(alternative overlapping frame)을 통해 전사(transcription)가 개시(initiation)되어 PB1-F2와 PB1-N40 단백질들이 발현되는 것으로 알려져 있다 (6, 7) (Fig. 1B). 이와는 다르게 PA-X 단백질은 기존 방법과는 달리 +1 리보솜 틀이동(+1 ribosomal frameshifting)이라는 과정을 통해 발현된다는 것이 밝혀졌다 (8). PA-X 단백질은 PA 유전자의 191개의 N-말단(N-terminal) 아미노산과 +1 리보솜 틀이동에 의해 그 위치부터 염기(nucleotide) 하나씩 밀려 61개 아미노산이 다른 것으로 변경되는 X-open reading frame (X-ORF)으로 구성되어 있다(Fig. 1C). Jagger 등은 이러한 +1 리보솜 틀이동이 PA 유전자에 존재하는 UCC UUU CGU C 모티프(motif)에 의해 발생하며, 이 모티프가 +1 리보솜 틀이동을 유발하는 기전을 다음과 같이 설명하였다. 일반적으로 +1 리보솜 틀이동은 UUU

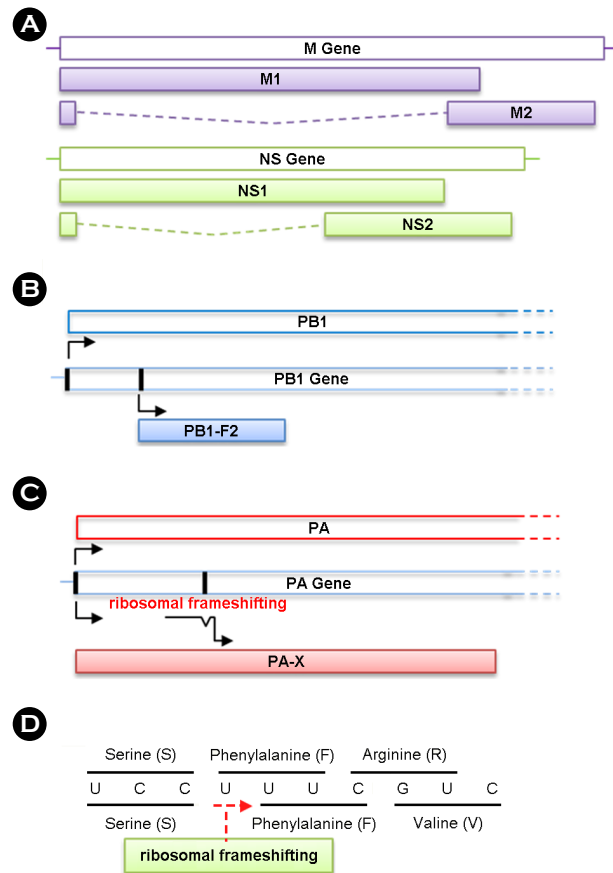


Figure 1. Multiple proteins are expressed from a single gene of influenza A virus. (A) The M2 and NS2 proteins are expressed by gene splicing. (B) The PB1-F2 protein is encoded from overlapped frame. (C) The PA-X protein is expressed by +1 ribosomal frameshifting. (D) 'UCC UUU CGU C' motif in PA gene is related with ribosomal frameshifting.

코돈(codon)이 리보솜 P-자리(ribosomal P-site)에 위치하고 CGU 코돈이 리보솜 A-자리(ribosomal A-site)에 위치하면 일어나는 것으로 알려졌다. 그러나 CGU는 포유동물과 조류에서는 거의 사용되지 않아 만약 이러한 코돈이 리보솜 A-자리에 위치하게 되면 해독(decoding) 속도가 느려져 번역(translation)이 잠시 멈추게 된다. 그리고 UUU와 UUC 코돈 모두 phenylalanine (F)을 지정하는데, 이전에 보고된 논문에 따르면 GAA를 안티코돈(anticodon)으로 갖는 tRNA^{phe}는 UUU보다 UUC에 더 강한 친화력(affinity)을 나타내는 것으로 보고되었다 (12). 따라서 리보솜 A-자리에 CGU 코돈이 위치하고 P-자리에 UUU가 위치할 때, 거의 사용되지 않는 CGU 코돈에 대한 안티코돈(anticodon)보다 염기 하나가 밀려(+1 slippage) 형성

된 GUC 코돈에 대한 안티코돈이 결합하게 되며, UUC 코돈에는 친화성이 높은 GAA 코돈이 결합하여 해독의 상대적인 속도차가 발생하는 +1 리보솜 틀이동이 발생하게 된다(Fig. 1D). Jagger 등은 이러한 가설을 유전자에 변이를 가한 모티프를 사용하여 리보솜 틀이동 효율(% frameshifting)을 분석하는 방법으로 증명하였으며, PA-X 단백질의 발현은 A형 인플루엔자바이러스에서 기존에 알려진 방법과는 다른 새로운 방식으로 조절된다는 사실을 밝혔다 (8). 이러한 사실로 미루어 볼 때 인플루엔자바이러스 유전자에는 아직 밝혀지지 않은 또 다른 단백질의 발현이 존재할 가능성이 있을 것으로 사료된다.

2. PA-X 단백질의 기능

PA 유전자의 N-말단에는 RNA를 자를 수 있는 endonuclease 기능이 있는 부위가 존재하는데, 이 부위는 cap-snatching된 숙주세포 pre-mRNA를 전사 시발체(primer)로 사용할 수 있게 적당한 크기로 잘라내는 기능을 수행한다 (13, 14). PA-X 단백질의 N-말단은 PA 단백질의 N-말단을 포함하나 PB1 단백질과 상호결합 할 수 있는 C-말단(C-terminal)의 아미노산 서열은 다르다. 이에, Jagger 등은 PA-X 단백질은 PA 단백질과는 다른 endonuclease 활성을 나타내는지 증명하기 위해 β -galactosidase를 발현하는 plasmid와 PA 유전자를 발현하는 plasmid를 co-transfection 하여 PA-X 단백질의 endonuclease 활성을 간접적으로 측정하는 실험을 수행하여 PA-X 단백질도 자체적으로 endonuclease 활성이 있음을 확인하였다 (8). 또한 PA-X 단백질이 바이러스가 감염된 세포에서 실제로 발현되는 것을 확인하였으며, PA-X 단백질의 발현 유무에 따른 바이러스의 성장능(growth kinetics)을 MDCK 세포주에서 분석한 결과 유의성 있는 차이는 없어 PA-X 단백질은 바이러스의 성장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 그러나 BALB/c 마우스를 이용한 병원성 평가 실험에서 PA-X가 발현되지 않는 바이러스는 PA-X가 발현되는 바이러스에 비해 병원성이 높게 나타났다 (8). 이에 Jagger 등은 PA-X 단백질이 마우스의 병원성에 어떻게 영향을 미치는지 그 원인을 분석하기 위해 PA-X 단백질을 발현하는 바이러스와 발현하지 않는 바이러스를 역유전학법(reverse genetics system)으로 제조하였다. 그리고 이 바이러스들을 감염시킨 마우스의 폐 조직에서 RNA를 추출하여 숙주 세포의 유전자 발현양상을 분석하였다. 그 결과 PA-X 단백질은 주로 염증반응(inflammatory response),

세포사멸(apoptosis), 면역반응(immune response)등과 관련된 유전자의 발현에 차이를 유발하였다. 특히 interferon- γ (IFN- γ), CD28, IL-7 (interleukin-7), interleukin-15 (IL-15) 등의 면역반응관련 신호전달(signaling)과 관련된 유전자들의 발현은 PA-X 단백질을 발현하지 않는 바이러스가 감염된 마우스보다 상대적으로 PA-X 단백질을 발현하는 바이러스가 감염된 마우스에서 감소되었다 (8). 이러한 결과들을 종합해 볼 때, PA-X 단백질의 발현은 바이러스의 병원성에 영향을 미치는 중요한 부속 단백질로의 기능을 갖는 것으로 사료된다.

결론

PA-X 단백질은 A형 인플루엔자바이러스가 발현하는 단백질 중 가장 최근에 밝혀진 단백질이다. Jagger 등은 PA-X 단백질은 PA 유전자로부터 +1 리보솜 틀이동에 의해 발현되며, PA 단백질처럼 자체적으로 endonuclease 활성을 갖고 있다는 사실을 밝혔다. 또한 PA-X 단백질의 발현이 바이러스 자체의 성장능에 영향을 미친진 않지만, 감염된 마우스의 병원성에는 영향을 미친다는 사실을 보고하였으며, 그러한 현상의 근거로 PA-X 단백질이 숙주 세포의 유전자 발현에 영향을 미친다는 근거를 제시하였다 (8). 2009년 대유행을 일으킨 H1N1 신종 인플루엔자 바이러스의 경우 PA-X 단백질의 길이가 다른 바이러스보다 짧은 것으로 알려졌다 (15). 하지만 PA-X 단백질에 대한 연구는 아직 초기 단계이므로 PA-X 단백질에 의한 병원성의 감소가 다른 바이러스주(strain) 또는 다른 아형(subtype)의 바이러스에도 동일하게 나타나는지 또한 다른 단백질과의 상호관련성이 있는지 이를 규명하기 위한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 사료된다. 즉 1918년에 대유행을 일으킨 인플루엔자바이러스의 PB1-F2 단백질은 병원성을 상승시키는 것으로 알려져 있어 (16, 17), 바이러스에 의한 병원성이 이 두 단백질의 상호작용에 의해 결정되는지 규명되어야 할 것이다. 또한 PA-X 단백질이 숙주의 어떤 신호전달 경로에 영향을 끼쳐 병원성이 조절되는지 이에 대한 심도있는 연구가 이루어진다면 새로운 항바이러스 표적으로도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 PA-X 단백질이 인플루엔자바이러스의 전파특성(transmissibility) 및 진화(evolution)에는 어떠한 역할을 수행했는지 이에 대한 궁금증도 풀어야 할 것이다. 그러므로 PA-X 단백질을 더 깊이 이해하

기 위한 연구는 앞으로 바이러스 학자들이 많은 관심을 가지고 도전할 새로운 개척분야가 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Landolt GA, Olsen CW. Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Anim Health Res Rev* 2007;8:1-21.
- 2) WHO. Fact sheet on influenza. 2009; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
- 3) Klenk HD, Garten W, Matrosovich M. Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays* 2011;33:180-8.
- 4) WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. 2012; Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html.
- 5) Nicholson KG WR, Hay AJ. Textbook of Influenza: Blackwell Science Ltd., 1998.
- 6) Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 2001;7:1306-12.
- 7) Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, *et al.* A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 2009;83:8021-31.
- 8) Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, *et al.* An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 2012;337:199-204.
- 9) Inglis SC, Brown CM. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res* 1981;9:2727-40.
- 10) Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4170-4.
- 11) Lamb RA, Lai CJ. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 1980;21:475-85.
- 12) Eisinger J, Feuer B, Yamane T. Codon-anticodon binding in tRNA^{phe}. *Nat New Biol* 1971;231:126-8.
- 13) Dias A, Bouvier D, Crépin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, *et al.* The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 2009;458:914-8.
- 14) Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* 2006;80:7789-98.
- 15) Shi M, Jagger BW, Wise HM, Digard P, Holmes EC, Taubenberger JK. Evolutionary Conservation of the PA-X Open Reading Frame in Segment 3 of Influenza A Virus. *J Virol* 2012;86:12411-3.
- 16) McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, *et al.* Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2007;2:240-9.
- 17) Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* 2006;80:7976-83.