

한국형 C형 간염 바이러스의 NS5 지역 cDNA 클로닝과 발현

서강대학교 생명과학과, ¹동아제약(주) 연구소

한동표 · 이택열¹ · 김원배¹ · 김병문¹ · 장미윤 · 양재명*

=Abstract=

Cloning and Expression of NS5 Region of Korean Type Hepatitis C Virus

Dong-Pyou Han, Taek-Youl Lee¹, Won-Bae Kim¹, Byong-Moon Kim¹,
Mi-Yoon Chang and Jai-Myung Yang*

Department of Life Science, Sogang University, Seoul 121-742, Korea, ¹Research Laboratories,
Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd., Yongin 449-900, Korea

Three cDNA fragments located within NS5 region of HCV were synthesized by RT using viral RNA extracted from blood sample of Korean patient as a template. The cDNAs were amplified by PCR, cloned into the T-vector, and the nucleotide sequences were determined. Comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequence of NS5 cDNAs showed that it is closely related with HCV type 1b. The cloned NS5 cDNA showed 91-94% homology at the nucleotide sequence level and 96-98% homology at the amino acid sequence level with several strains of the HCV type 1b. The NS5 cDNAs were subcloned into *E. coli* expression vectors to construct pRSETA5-1, pTHAN5-1, pRSETC5-2, pRSETBB1, pRESTCB1 and pRSETB-H3. Expression of the NS5 proteins was achieved by inducing the promoter with isopropyl-thio- β -D-galactoside (IPTG) and confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The NS5 proteins were immunoreactive against sera from Korean hepatitis C patients in Western blot analysis. Among the recombinant NS5 proteins, pRSETA5-1 plasmid derived protein, coded from aa2022 to aa2521 of HCV polyprotein, showed the strongest immunoreactivity against sera from Korean hepatitis C patients in immunoblot analysis. These results suggest that NS5 proteins would be useful as an antigen for detection of antibody against HCV in the blood samples.

Key Words: Hepatitis C Virus, NS5, Expression vector, Western blot

서 론

C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus, HCV)는 수혈에 의해 감염되는 non-A, non-B 간염 (NANBH)의 가장 중요한 요인으로 보고되었으며 [1] 급성 간염 이외에 만성 간염, 간경변증 그리고 간암으로 진전될 가능성이 B형 간염 바이러스 보다 더 큰 것으로 알려져 있다 [2~4]. 지금까지 사람에

서 감염을 일으키는 요인이 되는 바이러스로 Hepatitis A, B, C, D, E 그리고 G 등 6 종류가 밝혀졌으며 [5~9] 이들간에는 비슷한 병리학적 변화를 일으키며 유사한 임상적 증상을 보인다. 이 중 A형과 B형 간염 바이러스에 대한 진단법과 예방 백신은 개발되어 있으나 [2, 3, 10] C형 간염 바이러스를 포함한 다른 간염 바이러스에 대한 연구는 현재 활발히 진행 중에 있다. 특히 HCV는 분자 유전학적 연구에 의해 바이러스 지놈의 클론을 얻어 밝혀진 바이러스로 [11] 백신 개발

* Corresponding author

을 위한 분자 유전학적, 생화학적, 임상적, 및 면역학적 연구가 활발히 진행 중이다.

1989년 미국의 Choo 등 [11]에 의해 HCV의 전체 지놈 구조가 처음 밝혀진 이후 여러 종류의 HCV 지놈의 염기서열이 밝혀졌다. C형 간염 바이러스의 입자 크기는 30-70 nm로 외피에 둘러싸여 있으며 [12] 지놈은 약 320~340 nt 길이의 5' 말단과 27~55 nt 길이의 3' 말단의 암호화되지 않는 부분 (untranslated region, UTR)을 포함하여 약 9.4 kb의 (+) 단일가닥 RNA로 되어 있다 [13~15]. HCV 유전자는 하나의 긴 open reading frame (ORF)으로 구성되고 이로부터 약 3010 개의 아미노산으로 이루어진 다단백질 (polyprotein)이 합성된다. 다단백질의 아미노산 서열을 비교 분석하면 이들은 크게 구조 단백질과 비구조 단백질로 구성되어 있다 [14, 16, 17]. 구조 단백질은 core와 외피 당단백질을 암호화하는 E1과 E2/NS1으로 나누어지며 비구조 단백질은 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B로 이루어져 있다 (Fig. 1). 하나의 긴 ORF로부터 합성된 다단백질 중 구조단백질인 C, E1과 E2는 숙주의 signal peptidase에 의해 절단되고 비구조단백질들은 바이러스의 프로티아제에 의해 절단되어 각각의 기능을 갖는 단백질들로 분리된다 [18~22].

HCV 5'UTR 내의 염기 서열은 바이러스 종류마다 보존이 잘 되어 있어 이 부위가 중요한 기능을 지니고 있을 것이라고 추측되었으며 실제로 이 부위내에 폴리오바이러스에서와 같이 internal ribosome entry site (IRES)가 있어 바이러스의 해독 과정 조절에 관여할 것으로 보고되었다 [14, 23]. 구조 단백질인 core는 HCV RNA 지놈을 싸서 보호하는 capsid이며 외피 당단백질은 nucleocapsid를 싸고 있는 외피에 존재하는 당단백질이다. NS2는 NS3의 N 말단과 함께 metal-dependent autoprotease의 기능을 갖고 있어 NS2/NS3의 연결부위를 절단하는 것으로 알려져 있다 [22, 24]. NS3는 N 말단부위에 세린 프로티아제의 기능을 갖고 있어 나머지 비구조단백질들을 만들어 내는 것으로 밝혀졌고 [25, 26] 또한 C 말단부위에는 RNA helicase의 기능을 갖는 것으로 알려졌다 [14, 22, 27, 28]. NS4A는 프로티아제의 cofactor로 작용하는 막 단백질로서 NS3 프로티아제의 활성화에 중요한 기능을 하는 것으로 밝혀졌다 [29, 30]. NS5B는 바이러스 복제에 필요한 RNA중합효소의 기능을 갖는 것으로 알려져 있

으며 [22, 31] 그밖의 NS4B와 NS5A의 기능은 아직 확실하게 밝혀져 있지 않았다.

HCV는 바이러스마다 지놈의 염기서열 변이가 심해 염기서열 상동성을 기초로 HCV를 6개의 형으로 분류하고 있고 현재 다른 형의 HCV가 계속 밝혀지고 있다 [15, 32]. 미국, 유럽 등지에서는 type 1a가 주로 발견되고 한국과 일본 등 동북아시아에서는 type 1b가 주로 발생하고 있지만 [33] 지역에 따라 그 분포 양상이 다르다. 이와 같이 HCV 지놈 염기서열의 심한 차이는 그것이 코딩하는 단백질의 항원성을 변화시켜, type들 사이뿐 아니라 subtype 사이에서도 항원성의 차이가 날 수 있기 때문에 자기나라에서 주로 발견되는 HCV 항원을 사용하여 감염 환자의 진단에 이용되고 있다.

HCV 감염 여부를 진단하는 방법으로 초기에는 간염 질환의 병리학적 증상을 기초로 한 ALT 수치 측정과 함께 B형 간염 바이러스의 core 항원에 대한 항체의 존재 유무를 판단함으로써 HCV 감염 위험성 정도를 판단하였으나 HCV 항원이 클로닝된 후 현재는 ALT 수치 측정보다 HCV 감염 여부를 더 정확히 진단할 수 있는 방법으로 혈액내에 생성된 HCV에 대한 항체들의 존재 유무를 검사하는 효소면역측정법이 (Enzyme-linked immunosorbent assay, EIA)이 일반적으로 널리 사용되고 있다. 이 밖에도 HCV 감염 여부를 판단할 수 있는 방법에는 HCV 항원 자체를 검출하는 방법 및 HCV RNA 유전자를 검출하는 방법들이 있으나 HCV 항원 검출은 혈액내에 존재하는 HCV 항원들의 농도가 낮아 항원 검출에 어려움이 있으며 유전자 검출 방법은 현재 많은 연구가 진행되어 있어 EIA 보다 초기 검출이 가능하고 감도 (sensitivity) 및 특이도 (specificity)도 우수하나 아직까지는 경제적으로나 기술적으로 대량 검사 및 일반적으로 널리 사용하기에는 어렵다.

현재 HCV 감염 여부를 진단할 수 있는 EIA 방법은 사용 항원의 종류와 수에 따라 1세대, 2세대 및 3세대까지 개발되어 있다. 즉, 처음 개발된 1세대 EIA는 1989년 Kuo 등 [34]이 효모에서 생산한 HCV 비구조 단백질의 NS3와 NS4 연결부위인 c100-3 항원을 이용하여 HCV 항체를 측정하였으나 C형 간염환자를 초기에 검출하는데 한계가 있고 또한 위양성율이 높게 나타난다고 보고되었다 [35]. 이를 보완하기 위하여 2세대 EIA에서는 c100-3 이외에 core 지역의 항원 (c22-3)과 NS3 지

Table 1. Primers used for RT-PCR

Primers	Polarity	Sequences (5' to 3')	Position of 5' nucleotide ^a
S1	+	GGGTACAAGGGAGTCTGGCG	6381
A3	-	GCTGGATAGGTTCCGGACGT	7937
A3	+	CCAATACCACCTCCACGGAG	7308
A5	-	GGAGTAACAAGCCCCGTAGA	8957
S5	+	CCAATGTTGTGACTTGGCCC	8318
A6	-	TGGCCTATTGGCCTGGAGTG	9407

^a Nucleotide position was numbered by a system starting from the first base of the HCV-BK.

역의 항원 (c33c)을 더 첨가하여 감도 및 특이도를 향상시켰고 [36, 37] 3 세대 EIA에서는 c33c 대신 c33c를 c100-3까지 연장시켜 변형된 c200 항원을 사용하고 NS5 항원을 더 첨가함으로써 2 세대보다 감도 및 특이도를 더 향상시켰다 [37, 38].

NS5 지역의 epitope이 확인되고 NS5 지역이 RNA 중합효소 기능을 갖는 것으로 알려진 후 초기에는 NS5 항원에 대한 항체의 검출이 HCV RNA 존재와 관련하여 바이러스 증식의 증거로 이용될 수 있을 것으로 기대했지만 이와는 연관이 없는 것으로 보고되었다. 또한 3 세대에서 향상된 감도가 첨가된 NS5 항원의 영향보다는 주로 변형된 NS3 항원 (c33c)에 기인된 것이라는 보고가 있지만 [39~41], HCV 감염환자의 NS5 지역의 epitope에 대한 항체의 생성과 검출이 보고된 [42~44] 것을 고려할 때 NS5에 대한 항체를 갖는 더 넓은 범위의 HCV 감염환자를 검출해 낼 수 있다는 점에서 EIA에서 제외할 수 없는 항원으로 생각된다. 본 연구에서는 한국인 HCV 보균자의 혈청에서 분리한 HCV의 NS5 지역을 RT-PCR 방법을 이용하여 클로닝한 후 염기서열과 아미노산 서열을 확인하였고, 대장균 발현 벡터에 subcloning한 후 대장균에서 발현시켰으며, Western blot 방법을 통하여 발현된 NS5 단백질의 진단용 항원으로서 사용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. HCV RNA 추출

C형 간염 바이러스에 감염된 한국인 혈청 200 µl에 RNAzol™B 용액 (Cinna/Biotechx, Friendswood, TX) 800 µl를 넣고 2 분 동안 강하게 vortexing한 다음 chloroform 80 µl를 첨가하고 잘 섞은 후 15 분 동안 얼음에 방치하였다. 12,000×g에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후 동량의

isopropanol을 넣고 잘 섞은 다음 얼음에 15 분 동안 방치하였다. 12,000×g에서 15 분 동안 원심분리하여 침전물에 75% ethanol 용액 0.8 ml를 넣고 7,500×g에서 8 분 동안 원심분리하여 세척하고 10 분 간 진공 건조하여 역전사 효소 (reverse transcriptase; RT) 반응의 시료로 사용하거나 액체 질소 상태에서 보관하였다.

2. cDNA 합성

혈청에서 추출한 바이러스 RNA 침전물을 증류수 6 µl에 녹이고 antisense 시발체 1 µl (20 pmole)을 섞은 후 70℃에서 10 분 간 처리하고 얼음물에서 5 분 간 방치하였다. cDNA 합성 반응액 20 µl에는 주형 (template) RNA와 1 pmole의 antisense 시발체, 10 mM dithiothreitol (DTT), 1.5 mM의 dNTPs, RNasin 40 units, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV RT, Promega, Madison, WI) 7 units, 1X AMV RT 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM spermidine, 10 mM DTT)이 포함되어 있으며 이 반응액을 42℃에서 1 시간 반응 시킨 후 95℃에서 5 분 간 처리하여 RT를 불활성화 시켰다.

3. 시발체 (Primers)

역전사 효소 반응과 중합 효소 연쇄 반응에 사용한 시발체들은 type II인 HCV-BK, HC-C2, HC-JT, HCV-J, 및 HCV-T 등의 염기 서열이 동일한 부위를 선택하여 제작하였다. 시발체들의 염기 서열, 길이, 및 위치는 HCV-BK의 지놈 RNA를 기준으로 Fig. 1과 Table 1에 표시하였다.

4. 중합 효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)

Fig. 1에 HCV 지놈 구조상에서 중합 효소 반응에 사용할 시발체들과 생성물 위치를 표시하였

다. 첫번째 반응은 cDNA 합성용액 20 μ l에 sense 시발체 1 μ l (20 pmole), 각 5 mM인 dNTPs 2 μ l, 100 mM DTT 2 μ l, Taq DNA 중합효소 2 units 와 10 \times Taq DNA 중합효소 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 μ g/ml BSA) 10 μ l를 첨가하고 증류수로 최종 부피가 100 μ l가 되게 조절한 뒤 반응액의 증발을 막기 위해 mineral oil을 100 μ l 적층하여 실시하였다. 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 2 분 간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1 분 간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2 분 간 extension을 35 회 실시한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7 분 간 반응시켰다. 중합 효소 연쇄 반응 생성물은 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 이를 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 확인하였다.

5. 중합 효소 연쇄 반응 생성물의 클로닝과 염기 서열 결정

중합 효소 연쇄 반응 생성물을 전기 영동하여 예상되는 1.55 kb (NS5-1), 1.65 kb (NS5-2)와 1.09 kb (NS5-3)의 DNA 띠를 확인하고 겔로부터 각각의 DNA를 electroelution한 후 pMOSBlue T 벡터 (Amersham, Buckinghamshire, England)에 제조회사의 방법에 따라서 클로닝하여 각각 재조합 플라스미드 pTNS5-1, pTNS5-2와 pTNS5-3을 제조하였다. 제한 효소 *EcoRI*과 *HindIII*를 처리하여 삽입된 HCV cDNA 조각 (insert)을 확인한 재조합 플라스미드는 dideoxy-mediate chain termination 원리를 이용한 Sequenase version 2.0을 사용하여 공급사 (Amersham)의 사용방법에 따라 염기 서열을 결정하였다. Annealing은 반응액을 65 $^{\circ}$ C에서 2 분 간 방치한 다음 20 분 동안 온도를 30 $^{\circ}$ C까지 내리면서 실시하였고 labeling 반응은 상온에서 3 분 간 실시하였으며 종료 반응은 37 $^{\circ}$ C에서 5 분 간 실시하였다. 염기 서열은 exonuclease III를 처리하거나 적당한 시발체를 사용하여 sense와 antisense strand 양쪽에서 결정하였고, 결정된 염기 서열은 보고된 HCV의 ORF에 맞추어서 아미노산 서열을 결정한 뒤 기존에 보고된 다른 HCV 분리주와의 상동성을 DNASIS™ (Hitachi America, Ltd) 프로그램을 사용하여 조사하였다.

6. 재조합 발현 벡터의 제조

NS5-1과 NS5-2 cDNA를 발현 벡터에 클로닝하기 위하여 양쪽 말단에 서로 상보적인 시발체쌍

RS1 (5'-AAGGGACTCGAGCCCATGGACGGC ATCATGCAAACC-3')과 RA1 (5'-TAGGTTCCA TGGAAGCTTTGCTCATTAGCCAAATTTGGA-3'), RS2 (5'-GGCCGCCCATGGCCAATACCACCT CCACGGAG-3')와 RA2 (5'-CGGCCGAAGCTT ATCAGCTGGATAGGTTCCGGACGT-3')를 합성하였다. RS1에는 *XhoI*과 *NcoI*, RA1에는 *HindIII*, RS2에는 *NcoI*, RA2에는 *HindIII* 제한효소 자리를 각각 포함시켰으며, RS1/RA1과 RS2/RA2를 사용하여 각각 pTNS5-1과 pTNS5-2를 주형으로 중합 효소 연쇄 반응을 시행하였다. pTNS5-1을 주형으로 한 반응 생성물은 *XhoI/HindIII*로 절단한 다음 동일 효소로 절단한 pTrcHisA (Invitrogen, San Diego, CA)에 클로닝하여 pTHAN5-1을 제조하였고 pTHAN5-1을 *XhoI/HindIII*로 처리하여 삽입된 NS5-1 cDNA를 다시 분리한 다음 동일 효소로 절단한 pRSETA (Invitrogen)에 클로닝하여 재조합 발현 벡터인 pRSETA5-1를 제조하였다 (Fig. 2). pTNS5-2을 주형으로 한 반응 생성물은 *NcoI/HindIII*로 절단한 후 동일 효소로 절단한 pRSETC에 클로닝하여 pRSETC5-2의 재조합 발현 클론을 제조하였고, pRSETC5-2를 다시 *BamHI*과 *HindIII*, *PstI*과 *HindIII*로 절단하여 1.46 kb와 1.2 kb cDNA를 각각 분리한 후 *BamHI*과 *HindIII*로 절단한 pRSETB와 *PstI*과 *HindIII*로 절단한 pRSETC에 클로닝하여 pRSETBB1 과 pRSETCB1 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 또한 시발체 쌍 RS2와 RA3 (5'-CGGCCGAAGCTTATCAGCTGGATAGGT TCCGGACGT-3')을 사용하여 pTNS5-2를 주형으로 중합 효소 연쇄 반응을 시행하여 약 630 bp의 반응 생성물을 얻은 다음 *BamHI*과 *HindIII*로 절단한 후에 동일 효소로 절단한 pRSETB에 클로닝하여 pRSETB-H3를 제조하였다.

7. 재조합 플라스미드의 발현 및 Western blot 분석

HCV NS5 cDNA를 포함하는 재조합 발현 벡터를 대장균 BL21 (DE3)이나 DH5 α 에 도입시켜 발현 균주를 만든 후 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)를 사용하여 cDNA의 발현을 유도하였다. 발현 균주를 50 μ g/ml ampicillin이 포함된 LB 배양액에서 OD₆₀₀=0.8~1.0까지 배양하고 1 M IPTG로 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후에 12 시간 동안 배양하여 발현을 유도하였다. 배양액 0.5 ml를 원심 분리하여 얻은 균체들을 100 mM

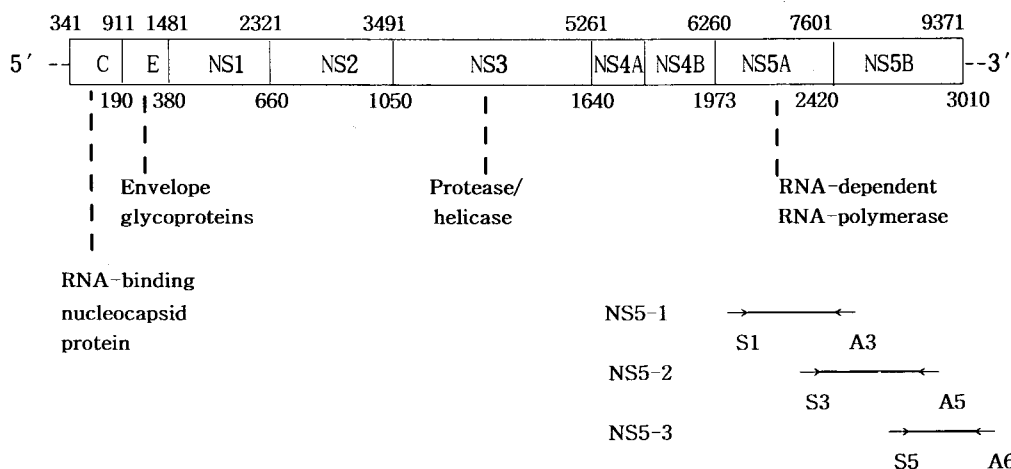


Fig. 1. Organization of the hepatitis C viral genome and position of primer pairs used for RT-PCR. The putative domains of the core (C), envelope (E), and nonstructural regions of the large open reading frame are boxed. Numbers above the box indicate the position of nucleotide and numbers below the box indicate the positions of amino acid. Three cDNA clones within NS5 region are described as a line with their primer pairs.

Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% (wt/vol) SDS, 20% glycerol, 및 0.2% bromphenol blue 등이 포함된 완충 용액으로 현탁시킨 후 100°C 에서 5 분 간 열 처리하여 용균시켰다. 용균된 세포들을 4~20% Tris-glycine gel (Novex Co., San Diego, CA)에서 전기영동한 후 Coomassie blue로 염색하여 NS5 단백질을 확인하였고 nitrocellulose (NC) membrane에 전이 (transfer)시켜 Western blot을 실시하였다. NC membrane은 비특이적인 결합을 막기 위해 5% 탈지 분유로 blocking하였고, PBS에 1: 200으로 희석된 C형 간염 환자의 혈청을 1차 항체로 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 다음, alkaline phosphatase-labeled goat anti-human antibody 1: 1000 희석액에서 다시 1 시간 동안 반응시킨 후 기질 용액(NBT-BCIP)을 첨가하여 발색시켰다.

결 과

1. NS5 지역 cDNA 클로닝과 염기서열 분석

HCV에 감염된 한국인 간염환자의 혈청으로부터 HCV의 RNA를 분리하여 NS5 cDNA 합성의 주형 (template)으로 사용하였다. NS5 유전자에 상보적인 시발체를 사용한 역전사 효소 반응과 중합 효소 반응을 시행하여 HCV의 NS5 cDNA를 합성하였다. 시발체쌍 S1/A3, S3/A5 및 S5/A6 등을 이용한 중합 효소 반응을 시행한 결과 약 1.55 kb (NS5-1), 1.65 kb (NS5-2) 및 1.09 kb (NS5-3) 크

Table 2. Amino acid (nucleotide) sequence homology of NS5 region of HCV obtained from Korean carrier^a

HCV type	HCV isolates	NS5-1	NS5-2	NS5-3
1a	HCV-1	89(77)	91(79)	93(83)
1b	HCV-J	98(91)	96(91)	96(94)
	HCV-BK	98(92)	96(92)	96(94)
	HC-C2	98(92)	97(93)	96(92)
2a	HC-J6	63(61)	69(62)	73(70)
2b	HC-J8	62(61)	67(59)	73(70)
3a	GB48		72(70)	
3b	Tb		72(69)	
4a	EG-7		71(67)	
5a	SA156		79(71)	
6a	HK-2		79(66)	

^aThe followings are EMBL/GenBank accession numbers for the sequence data. HCV-1, N62321; HCV-J, D90208; HCV-BK, M58335; HC-C2, D 10934; HC-J6, D00944; HC-J8, D10988; GB48, L29614; Tb, D10080; EG-7, L23468; SA156, L 23471; and HK-2, L23475.

기의 반응 생성물을 각각 얻었다.

NS5-1, NS5-2 및 NS5-3을 pMOSBlue T-벡터에 클론하여 재조합 플라즈미드 pTNS5-1, pTNS5-2, 및 pTNS5-3을 각각 제조하였다. 재조합 플라즈미드의 염기서열을 결정한 뒤 reading frame을 확인한 다음 아미노산 서열을 유도하였다 (Fig. 3).

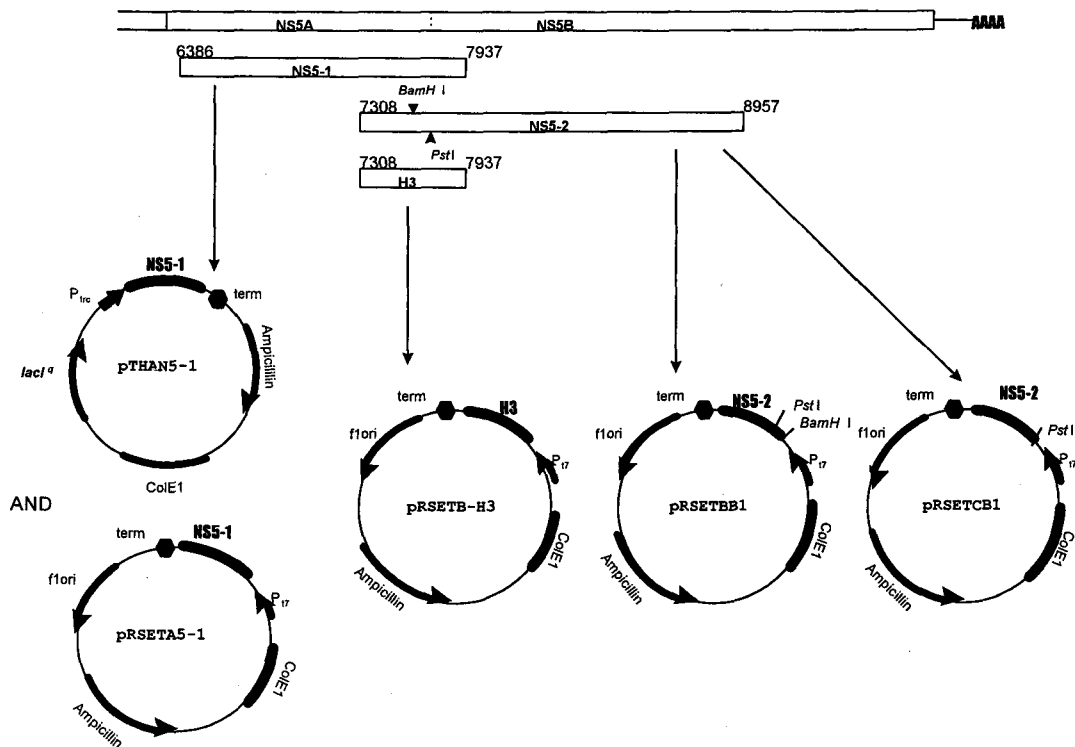


Fig. 2. Location of cDNA in NS5 region and genetic map of recombinant plasmids for expression in *E. coli*. pRSETA and pTrcHis plasmids containing the T₇ and the *trc* promoter could be induced by IPTG. The expression plasmid pRSETA5-1 or pTHAN5-1 was constructed by ligating NS5-1 cDNA with the pRSETA or pTrcHisA. The pRSETC5-2 was constructed by ligating NS5-2 cDNA with the pRSETC, and the pRSETB-H3 was constructed by ligating NS5-H3 with pRSETB. The pRSETBB1 and pRSETCB1 were constructed by ligating pRSETB5-2 with NS5-2 fragments generated by digesting pRSETC5-2 with *Bam*HI/*Hind*III and *Pst*I/*Hind*III.

NS5-1의 3' 말단과 NS5-2의 5' 말단의 625 bp (01-2)와 NS5-2의 3' 말단과 NS5-3의 5' 말단의 640 bp (02-3)는 서로 중복된 부분인데 (Fig. 1), 01-2와 02-3의 염기서열을 두 클론들 사이에 비교하였을 때 7 개 (1.12%)와 6 개 (0.94%)의 염기 차이가 각각 있었고, 유도된 아미노산은 3 개와 4 개의 차이가 각각 있었다 (Fig. 3).

클론된 HCV NS5 cDNA의 염기와 아미노산 서열을 다른 종류 HCV type들과 상동성을 서로 비교하였는데, 1b type에 속하는 스트레인들과 NS5 위치에 따라 염기와 아미노산 서열은 91~94%와 96~98%의 높은 상동성을 각각 보였다 (Table 2).

2. NS5 지역 단백질의 발현

NS5 지역의 단백질을 발현하기 위하여 발현 벡터 pTHAN5-1가 도입된 대장균 DH5 α 와 pRSETA5-1, pRSETCB1, pRSETBB1 및 pRSETB-H3이 각각 도입된 대장균 BL21 (DE3)를 LB 배지에서 배

양하면서 1 M IPTG를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 HCV NS5 cDNA의 발현을 유도하였다. 발현 벡터 pTHAN5-1은 *trc* 촉진자하에서 발현이 조절되고 *lac* operator를 포함하고 있어 IPTG에 의하여 발현이 유도되며 6 개의 His가 포함된 약 3 kDa의 단백질과 융합된 형태로 발현된다. pRSETA5-1, pRSETCB1, pRSETBB1과 pRSETB-H3 발현벡터는 T7 촉진자하에서 발현이 조절되며 BL21 (DE3) 균주 지놈내에 포함되어 있고 IPTG에 의하여 발현이 유도되는 T7 중합효소에 의하여 6 개의 His가 포함된 약 3 kDa의 단백질이 융합된 상태로 HCV cDNA가 발현된다.

HCV 다단백질의 aa2022부터 약 500개의 아미노산을 코딩하는 pRSETA5-1 재조합 발현 벡터의 발현을 유도한 후 SDS-PAGE를 실시하여 66 kDa 정도의 위치에서 발현된 단백질을 확인하였으며 (Fig. 4A), 동일한 cDNA를 pTHAN5-1 발현 벡터에서 발현을 유도하였을 때 SDS-PAGE 상에서는

RS1

6386 AAGGGAGTCTGGCGGGGGACGGCATCATGCAAACACCTGCCCATGTGGAGCACAGATCACGGACATGTCAA
2016 K G V W R G D G I M Q T T C P C G A Q I T G H V K

6466 AACGGTTCATGAGGATCATTGGGCCAAAACCTGCAGCAACACGTGGCATGGAACATTCATCCATCAACGCATACACCACGGGCCCATGC
2041 N G S M R I I G P K T C S N T W H G T F P I N A Y T T G P C

6556 ACGCCCTCCCGCGCCGAACTACTCTAGGGCGTGTGGCGAGTGGCTGCCGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTCCAC
2071 T P S P A P N Y S R A L W R V A A E E Y V E V T R V G D F H

6646 TACGTGACGGGCATGACCACTGACAACGTAATAATGCCCATGCCAGGTTCCGGCCCTGAATTCTTCACGGAGGTGGACGGAGTGCCTG
2101 Y V T G M T T D N V K C P C Q V P A P E F F T E V D G V R L

6736 CACAGGTACGCTCCGGCGTGCAGACCTCTCCTACGGGATGAGGTCGTATTCCAGGTCCGGCTCAACCAATTCGGGTTGGGTCACAACCTC
2131 H R Y A P A C R P L L R D E V V F Q V G L N Q F P V G S Q L

6826 CCATGCGAGCCCAACCGGATGTGGCAGTGTCTACTTCCATGTCTACCACCCCTCCACATTACAGCAGAGACGGCTAAGCGCAGGTTG
2161 P C E P E P D V A V L T S M L T D P S H I T A E T A K R R L

6916 GCCAGGGGCTCCCCCTTCTTGGCCAGCTTTCAGCTAGCCAGTGTGCTGCGCTTCTTTGAAGCGACATGTACTACCCATCATGAT
2191 A R G S P P S L A S S S A S Q L S A P S L K A T C T T H H D

7006 TCCCGGACGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTTCTGTGGCGGACAGGAGATGGCGGGAAACATCACCCGTGTGGAGTGCAGGAAACAGGTA
2221 S P D A D L I E A N L L W R Q E M G G N I T R V E S E N K V

7096 GTAATCCTGGACTCTTTCGAACCGATTTCGAGCGGAGGAGACGAGAGGGAGGTATCCGTTGCGCGGAGATCCTGCGGAAATCCAGGAAA
2251 V I L D S F E P I R A E E D E R E V S V A A E I L R K S R K

7186 TTCCCGACGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTGGAGTCTGGAAGGAACCGAACTATGTGCTCCGGTG
2281 F P A A M P I W A R P D Y N P L L E S W K E P N Y V A P V

RS2

7276 GTGCATGGATGCCACTGCCACCTGCCAAGGCCCTCCAATTCACCTCCACGGAGGAAGAGGACGGTGTCTGACAGAGTCCACCGTG
2311 V H G C P L P P A K A P P I P P P R R K R T V V L T E S T V

7366 TCCGATGCCTTGGCGGAGCTTGTCTACCAAGACCTTCCGCGAGCTCCGGATCGTCCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCACCAGGCTCCTGAC
2341 S D A L A E L A T K T F G S S G S S A V D S G T A T G P P D

A BamHI

7456 CAGGCCCTCCGGCAACGGCGACAGAGAATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCTATGCCCCCTTGGAGGGAGCCGGGGATCCTGATCTC
2371 Q A S G N G D R E S D V E S Y S S M P P L E G E P G D P D L

7546 AGTGACGGGCTTGGTCTACCGTGAGCGAGGAGGCTAGTGAG GACGTCGTCTGTGTCTCAATGTCCTACACATGGACAGGTGCCTAATC
2401 S D G S W S T V S E E A S E(G)D V V C C S M S Y T W T G A L I

C

7636 ACGCCATGCGCCGACAGGAAAGTAAGITGCCATCAACTCG TTGAGCAACTCCTTGTCTGCCACCACAACATGGTGTATTCCACAACA
2431 T P C A A E E S K L P I N S(P)L S N S L L R H H N M V Y S T T

G PstI

7726 TCCCGCAGTGCAGG CTGCGGCAGAAGAAGTACCTTTGACAGACTGCAGGTCCTGGACGACCAITACCGGGACGTCTCAAGGAGATG
2461 S R S A R(G)L R Q K K V T F D R L Q V L D D H Y R D V L K E M

T C RA1

7816 AAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCGGTAGAAGAAGCCTGTAAGCTGACGCCCCACATTCGGCTAAATCCAAATTT
2491 K A K A S T V K A K L L S V E E A C K L T P P H S A K S K F

RA3

7906 GGCTATGGGGCAAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACACATCCTCTCCGTGTGGAAGGACTTGTGGAAGACACTGAG
2521 G Y G A K D V R N L S S K A V N H I L S V W K D L L E D T E

7996 ACACCAATCGACACCACCGTCATGGCAAATAAGAGTCTTCTGTGTACAGCCAGAGAAGGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTA
2551 T P I D T T V M A K N E V F C V Q P E K G G R K P A R L I V

8086 TTCCAGATCTGGGAGTTCGTGTATGCGAGAAGATGGCTCTTTATGATGTGGTCTCCACTCTCCCTCAGGCCGTGATGGGCTCCTCATAC
2581 F P D L G V R V C E K M A L Y D V V S T L P Q A V M G S S Y

Fig. 3. HCV NSS cDNAs and amino acid sequences. The location of primers used for subcloning into the expression vectors are indicated by line above the nucleotide sequence. The unidentical nucleotides and amino acids within overlapped region between the cDNA clones are written in bold.

8176 GGATTCCAATACTCTCCCAAGCAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATGCCTGGAGATCGAAGAAAAACCCATGGGCTTCTCATATGACACT
2611 G F Q Y S P K Q R V E F L V N A W R S K K N P M G F S Y D T
G
8266 CGCTGTTTTGACTCAACGGTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCGATTTACCAATGTTGTGACTTGACC CCCGAAGCCAGACAG
2641 R C F D S T V T E N D I R V E E S I Y Q C C D L T(A)P E A R Q
G G
8356 GCCATAAGGTCGCTCACAGAGCGGCTTTATGTGCGGGGTCGCCCTGACCAATTCAAAAGGGCAGAACTGTGGTTATCGCCGGTGC CGCGCG
2671 A I R S L T E R L Y V G G P L T N S K G Q N C G Y R R C R A
C
8446 AGCGGCGTGTGACGACTAGCTGCGGCAATACCCCTCACATGTTACTTGAAGGGC ACTGCGGCCTGTCGAGCTGCAAAGCTCCGGGACTGC
2701 S G V L T T S C G N T L T C Y L K
8626 GCTATGACTAGGTACTCTGCCCT CCCGGGACCCGCCAGCCAGCATACGACTTGGAGCTGATAACATCATGCTCTCCAATGTGTCA
2761 A M T R Y S A P(L)P G D P P Q P A Y D L E L I T S C S S N V S
T
8716 GTCGCTCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTTACTACCTACCCGTGACCCACCACCCCTT GCACGAGCTGCGTGGGAGACAGCCAGA
2791 V A H D A S G K R V Y Y L T R D P T T P L(F)A R A A W E T A R
RA2
8896 ATCCTTCTAGCCAGGAGCAACTTGAAAAGCCCTGGATGTCAGATCTACGGGCTTGTACTCCATTGAGCCACTAGACCTACCTCAG
2851 I L L A Q E Q L E K A L D C Q I Y G A C Y S I E P L D L P Q
8986 ATCATTGAACGACTCCATGGTCTTAGCGCATTTCCTCCATAGTTACTCTCCAGGTGAGATCAATAGGGTGGCTTATGCCTCAGGAAA
2881 I I E R L H G L S A F S L H S Y S P G E I N R V A S C L R K
9076 CTTGGGGTACCGCCCTTGCAGCCTGGAGACATCGGGCCAGGAGCGTCCGCGCTAAACTACTGTCCAGGGGGGAGGGCCCTACTTGC
2911 L G V P P L R A W R H R A R S V R A K L L S Q G G R A A T C
9166 GGCAAATACCTCTTCAACTGGGCAGTAAAGACCAAGCTCAAACCTCACTCCAATCCGGCTGCGTCCCGCTGGACTTGTCCGGCTGGTTC
2941 G K Y L F N W A V K T K L K L R P I P A A S R L D L S G W F
9256 GTTGCTGGTTACGACGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCGTTGGTTCATGTTCTGCTACTCTACTTCTGTG
2971 V A G Y D G G D I Y H S L S R A R P R W F M F C L L L L S V
9346 GGGGTAGGCATCTACTGCTCCCAACCGGTGAACAGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCA
3001 G V G I Y L L P N R *

Fig. 3. Continued.

발현된 단백질을 확인할 수 없었다 (Fig. 5B의 lane 4).

NS5-2 cDNA를 발현시키기 위하여 pRSETC5-2를 제조하였으나 NS5-2의 발현이 확인되지 않아 염기서열 결정 후 밝혀진 NS5-2 cDNA 5' 말단 부위에 존재하는 *Bam*HI과 *Pst*I 제한 효소 자리를 이용하여 발현 벡터 pRSETBB1과 pRSETCB1을 각각 제조하였다. pRSETBB1은 발현벡터 pRSETC5-2 내의 NS5-2 cDNA의 5' 말단 부위 226 bp가 *Bam*HI에 의하여 제거된 NS5-2 cDNA가 클로닝된 발현벡터로 HCV 다단백질의 aa 2397부터 523 아미노산을 코딩하고 있고 pRSETCB1은 발현벡터 pRSETBB1 내의 NS5-2 cDNA보다 5' 말단 부위 476 bp가 *Pst*I에 의하여 제거된 NS5-2 지역의 cDNA가 클로닝된 발현벡터로 aa 2477부터 401 아미노산을 코딩하고 있다. pRSETBB1과 pRSETCB1 재조합 클론의 발현을 각각 유도한 후 SDS-PAGE 전기영동을 시행한 결과 62 kDa와 58 kDa 위치에서 발현된 단백

질을 각각 확인하였다 (Fig. 5A와 6A).

NS5-1과 NS5-2 cDNA가 서로 겹치는 부분 (다단백질의 aa2323-2532)을 클로닝한 재조합 발현 벡터 pRSETB-H3 클론의 발현을 유도하여 SDS-PAGE을 수행한 결과 24 kDa 정도의 재조합 발현 단백질이 확인되었다 (Fig. 6A의 lane 4).

BL21 (DE3) 균주에서 발현되는 단백질은 IPTG가 첨가되지 않는 비유도시에도 소량으로 발현되는 것이 Western blot 상에서 확인되는데 이는 BL21 (DE3) 지놈으로부터 발현되는 T7 RNA 중합효소가 IPTG가 없는 조건에서도 낮은 수준으로 발현되기 때문으로 생각된다.

3. Western blot 분석

발현된 HCV NS5 cDNA의 항원성을 알아 보기 위하여 한국인 C형 간염환자의 혈청과 구입한 Anti-HCV mixed titer performance panel PHV204 (Boston Biomedica, Boston, MA) 중 NS5 항원에

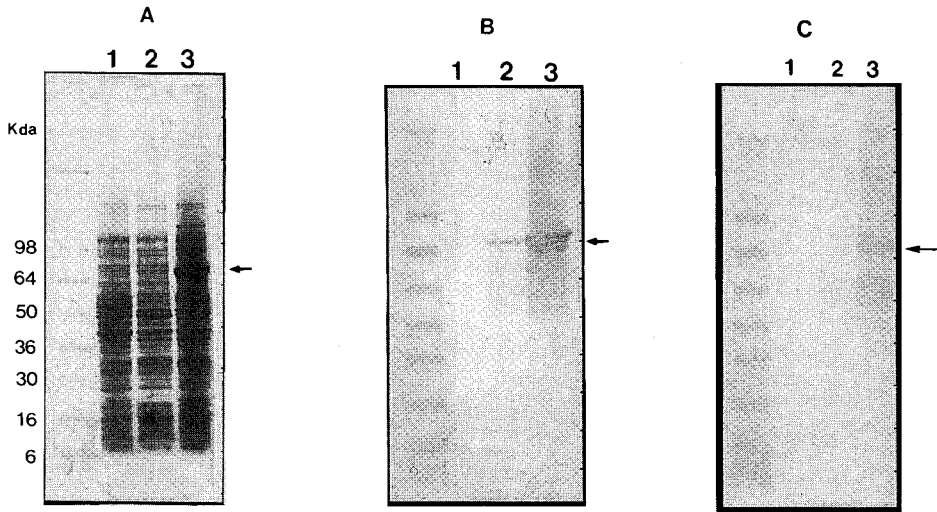


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B and C) of HCV NS5-1 protein expressed by pRSETA5-1. Western blot analysis was performed with the mixture of Korean sera positive for anti-HCV (B) and with member of anti-HCV mixed titer performance panel PHV204 positive for anti-HCV NS5 purchased from Boston Biomedica Inc (C). Lane 1; lysates of untransformed *E. coli* BL21, lanes 2 and 3; lysates of BL21 transformed by pRSETA5-1, uninduced (lane 2) and induced with IPTG (lane 3).

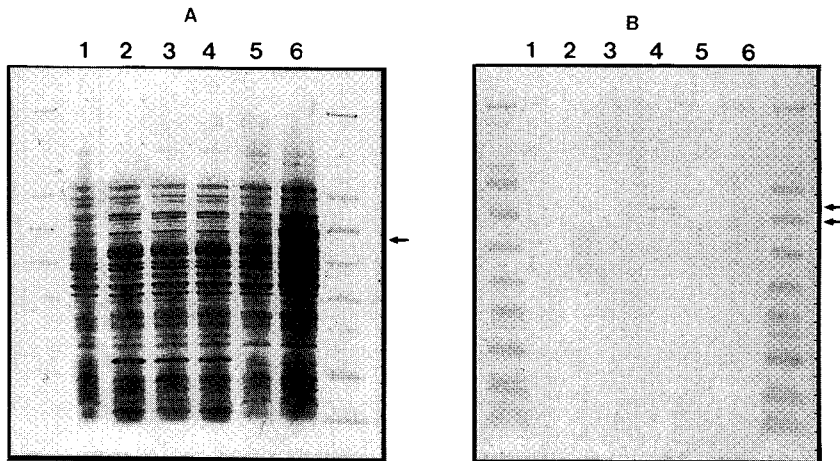


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of HCV NS5 recombinant proteins expressed by pTHAN5-1 and pRSETC5-2. Lanes 1 and 2; lysates of untransformed *E. coli* BL21 and DH5 α , lanes 3 and 4; lysates of DH5 α transformed by pRSETC5-1, uninduced (lane 3) and induced with IPTG (lane 4). Lanes 5 and 6; lysates of BL21 transformed by pRSETC5-2, uninduced (lane 5) and induced with IPTG (lane 6).

대한 양성 panel 혈청을 사용하여 Western blot을 실시하였다. Western blot 분석은 각 항원의 항원성을 비교하기 위하여 동일한 조건으로 실시하였다. Western blot 분석 결과는 한국인 간염환자의 혈청과 pRSETA5-1에서 발현된 항원이 가장 강한 반응성을 보였으며 (Fig. 4B) PAGE 상에서는 확인이 안된 pTHAN5-1로부터 발현된 동일 항원에 대해서도 Western blot 상에서는 확인이 됨으로서 (Fig. 5B의 lane 4) NS5의 다른 지역에서 발현된 항원보다 항원성이 우수한 것으로 나

타났다. 또한 외국인 혈청이라 할 수 있는 BBI사 (Boston Biomedica Inc.)의 항 HCV 항체 panel에 대해서도 한국인 혈청과 유사한 반응성을 보여 (Fig. 4C) HCV 감염 진단에 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다. NS5-2 지역의 cDNA를 발현하는 두 종류의 발현벡터 pRSETCB1과 pRSETBB1으로부터 발현된 단백질의 Western blot 결과는 pRSETBB1으로부터 발현된 재조합 단백질만 HCV 간염환자의 혈청과 약하게 반응하는 것으로 나타났고 (Fig. 5B의 lane 6) NS5-1과 NS5-2

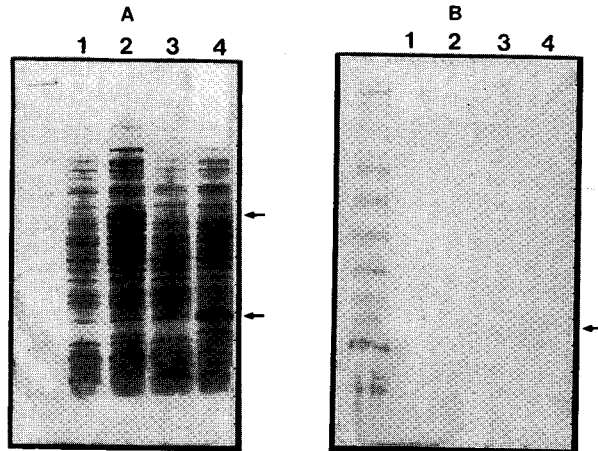


Fig. 6. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of HCV NS5 recombinant proteins expressed by pRSETBB1 and pRSETB-H3. Lanes 1 and 2; lysates of *E. coli* BL21 transformed by pRSETBB1, uninduced (lane 1) and induced with IPTG (lane 2). Lanes 3 and 4; lysates of BL21 transformed by pRSETB-H3, uninduced (lane 3) and induced with IPTG (lane 4).

cDNA가 서로 겹치는 부분 (다단백질의 aa2323-2532)을 클로닝한 재조합 발현 벡터 pRSETB-H3로부터 발현된 재조합 발현 단백질도 한국인 C형 간염환자 혈청에 대해 반응성을 보였다 (Fig. 6B). 그러나 BBI사의 항 HCV 항체 panel에 대해서는 위의 항원들은 반응성을 보이지 않았다.

고 찰

HCV는 염기서열의 변이가 다양하므로 전체 유전자의 염기 서열의 상동성이 91% 이상이면 동일한 type으로 분류하며 subtype은 77~80%, 다른 type 사이는 66~69%로 구분한다 [45]. 이러한 다양한 HCV는 발생하는 지역에 따라 발생하는 type의 종류와 빈도가 크게 차이가 있다. 한국과 일본에서는 HCV 1b type이 높은 비율로 발생하기 때문에 NS5를 클로닝하기 위하여 1b type에 속하는 여러 스트레인의 염기서열을 비교하여 시발체 쌍을 제조하였고, 그것들 중에서 S1/A3, S3/A3, S3/A5 및 S5/A5가 HCV-NS5 지놈의 RT-PCR에 효과가 좋은 시발체 쌍으로 나타났다.

HCV 유전자의 염기서열의 변이는 돌연변이에 의해서 이루어지는데 HCV에 만성적으로 감염된 동일한 사람에서 다른 염기서열을 가지는 것이 알려져 있다. 8년 이상 HCV가 만성적으로 감염된 사람과 침팬지에서 HCV 유전자의 염기서열을 분석하면 1년 동안에 하나의 염기가 치환될 확률은 $1.44-1.92 \times 10^{-3}$ 로 조사되었고 [46, 47], 동

일한 사람으로부터 클로닝한 다른 클론들의 염기서열의 차이는 전체 유전자의 약 1% (NS5 유전자의 경우에는 0.9%)인 것으로 조사되었다 [48]. 본 연구에서도 동일한 지역 (01-2와 02-3 부위)을 클로닝한 다른 클론들 사이에 평균 1%의 염기 서열에 차이가 있었다. 이것은 감염된 HCV가 복제하면서 약 1% nucleotide 변이를 갖는 많은 HCV 지놈이 동일한 사람에게 존재하는 것을 의미하는데, 아마도 복제 과정중 교정 (proofreading) 능력이 낮은 RNA 복제효소에 의한 복제의 오류와 주위 환경에 대한 지놈의 면역 선택에 의해서 일어나는 것으로 추정된다 [50].

C형 간염 환자는 인터페론 α -2b, β (INF α 2-b, β)을 투여하여 치료하고 있으나 일부 환자에서만 효과를 보이거나 anti-IFN 항체 형성, 자가 면역 등의 부작용 때문에 [28, 49, 50] 완전한 치료가 어려워 예방을 위한 백신 개발의 필요성이 높다. HCV는 조직배양 세포내에서 효율적으로 복제하지 못하기 때문에 백신 개발을 위해 필요한 만큼의 양을 생산할 수 없어 재조합 백신 개발에 많은 관심이 모아지고 있다.

HCV 감염의 진단에는 혈액내에 존재하는 HCV 항원들의 농도가 낮아 항원을 직접 검사하기 어렵기 때문에 혈액에서 생성된 HCV에 대한 항체들의 존재 유무를 검사하고 있다. HCV 비구조 단백질 부위인 NS3와 NS4 연결부위를 발현한 C100-3 항원을 이용하여 HCV 항체를 측정하는 방법이 처음 개발되었고 이후 감도 및 특이도

등을 향상시키기 위해 core, NS3 및 NS5 항원부위를 첨가하여 HCV 항체 진단에 사용하고 있다 [37, 38, 51]. HCV 감염 검사에는 HCV subtype 간의 차이로 발생할 수 있는 항원 반응 감도의 저하를 막기 위해 그 나라에서 주로 발견되는 HCV 항원들의 사용이 요구된다. 국내에서도 core, NS3, 및 NS4 재조합 단백질이 대장균에서 발현되어 한국인 C형 간염 환자에 대한 진단 가능성이 제시되었다 [52].

최근 HCV 지놈내에서 그 변이성이 가장 적은 NS5 유전자 재조합 단백질이 환자의 혈청과 반응성이 좋은 것으로 알려졌다. Rosa 등 [53]은 합성한 octapeptides를 이용하여 HCV의 NS5 유전자의 epitope 지도를 작성하였는데 immunogenic determinant는 HCV 다단백질 aa 2299-2313에 위치하는 것으로 나타났다. 그러나 이와 같은 항원 지역은 바이러스 스트레인 사이에 차이가 심하기 때문에 단일 펩티드를 이용하는 HCV 항체조사의 감도를 떨어뜨린다 [54, 55]. 본 연구에서 한국인 C형 간염 환자에서 분리한 HCV의 NS5 cDNA를 여러 종류 발현 벡터를 이용하여 발현시켰을 때 immunogenic determinant 부분이 존재하지 않은 pRSETCB1, pRSETB-H3와 pRSETBB1에서 발현된 항원은 HCV 환자의 혈청과는 반응을 보이지 않거나 약한 반응성을 보였으나 이 부분이 포함된 pRSETA5-1에서 발현된 항원은 한국인 C형 간염 환자의 혈청과 강한 반응을 보였으며 또한 BBI (Boston Biomedica Inc.)에서 공급되는 NS5 항원에 대한 양성 panel 혈청에도 항원성을 보여 pRSETA5-1의 발현 항원은 진단 시약의 항원으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

결 론

HCV에 감염된 한국인 간염환자의 혈청으로부터 분리한 RNA를 주형으로 RT 반응을 시행하여 NS5 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 PCR에 의해서 증폭하고, T-벡터에 클로닝한 후 염기서열을 결정하였다. 이 cDNA의 염기와 아미노산 서열은 HCV type 1b와 가장 높은 상동성을 보였고, 1b type에 속하는 여러 스트레인의 염기서열과 아미노산 서열의 상동성은 91~94%와 96~98%를 보였다. NS5 cDNA를 대장균 발현 벡터에 subcloning하여 재조합 플라스미드 pRSETA5-1,

pTHAN5-1, pRSETC5-2, pRSETBB1, pRSETCB1 및 pRSETB-H3 등을 제조하였다. IPTG로 NS5 단백질의 발현을 유도하고, 발현된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 확인하였다. Western blot 분석에서 발현된 NS5 단백질은 한국인 간염 환자의 혈청에 항원성을 보였다. 재조합 NS5 단백질 중에서 HCV 다단백질의 aa2022부터 aa2521까지 코딩하는 pRSETA5-1에 의해 발현되는 재조합 단백질은 한국인 C형 간염환자의 혈청을 사용한 Western blot 분석에서 강한 반응성을 보였다. 이같은 결과는 NS5 단백질이 혈액 내에 존재하는 HCV에 대한 항체를 탐지하는 항원으로 유용할 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Alter HJ: The hepatitis C virus and its relationship to the clinical spectrum of NANB hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 5: 78-94, 1990.
2. Ginsberg HS, Dulbecco R: *Virology* 2nd ed. Chap. 63. Hepatitis Viruses. JB Lippincott. 321-334, 1988.
3. Pol S, Thiers V, Nalpas B, Degos F, Gazengel C, Carnot F, Tiollais P, Wands JR, Berthlot P, Brechot C: Monoclonal anti-Hbs antibodies radioimmunoassay and serum HBV-DNA hybridization as diagnostic tools of HBV infection: relative prevalence among HBsAg-negative alcoholics, patients with chronic hepatitis or hepatocellular carcinomas and blood donors. *Eur J Clin Invest* 17: 515-521, 1987.
4. Choo QL, Han J, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Kuo G, Houghton M: Hepatitis C virus is a distinct relative of the flaviviruses and pestiviruses. In: Shikata T, Purcell RH, Uchida T eds. *Proceedings of the 1989 international symposium on viral hepatitis C*, D and E. Amsterdam: Elsevier Science Publishers 47-52, 1991.
5. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM., Savinov AP, Poleschuk VF: Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal oral route. *Intervirolgy* 20: 23-31, 1983.

6. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH: Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182: 1026-1028, 1973.
7. Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW, Krugman S: Relation of Australia-SH antigen to the Willowbrook MS-2 strain. *New Engl J Med* 281: 119-122. 1969.
8. Simons JN, Leary TP, Daeson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK: Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1: 564-569, 1995.
9. Linnen J, Wages J, Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih WK, Young L, Piatk M, Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SKH, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271: 505-508, 1996.
10. Prince AM, Ikram H, Hopp TP: Hepatitis B virus vaccine: identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. *Proc Natl Acad Sci* 79: 579-582, 1982.
11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
12. Collett M: Molecular genetics of pestiviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15: 145-154, 1992.
13. Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, Houghton M: Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1711-1715, 1991.
14. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M: The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* 60: 167-177, 1990.
15. Takamizawa A, Mori C, Fuke ., Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onish E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H: Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 65: 1105-1113, 1991.
16. Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S: Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolated: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188: 331-341, 1992.
17. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M: Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolates from a human carrier: comparison with reported isolated for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 72: 2697-2704, 1991.
18. Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, Suzuki T, Katayama T, Takebe Y, Saito I, Miyamura T: Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol* 65: 3015-3021, 1991.
19. Hsu HH, Donets M, Greenberg HB, Feinstone SM: Characterization of hepatitis C virus structural 20. Matsuura Y, Harada S, Suzuki R, Watanabe Y, Inoue Y, Saito I, Miyamura T: Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J Virol* 66: 1425-1431, 1992.
21. Pozzetto B, Bourlet T, Grattard F, Bonneval L: Structure, genomic organization, replication and variability of hepatitis C. *Nephrol Dial Transplant* 11: 2-5, 1996.
22. Neddermann P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P, Tramontano A, De Francesco R: The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. *Biol Chem* 378: 469-476, 1997.
23. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A: Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells

- is mediated by an internal ribosome binding mechanism. *J Virol* 67: 3338-3344, 1993.
24. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM: A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10583-10587, 1993.
 25. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2451-2455, 1991.
 26. Shoji I, Suzuki T, Chieda S, Sato M, Harada T, Chiba T, Matsuura Y, and Miyamura T: Proteolytic activity of NS3 serine protease of hepatitis C virus efficiently expression in *Escherichia coli*. *Hepatology* 22: 1648-1655, 1995.
 27. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, Choo QL, Houghton M, Kuo G: Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 87: 6547-6549, 1990.
 28. Suzuki H: Treatment of chronic hepatitis C with human interferon- α : A randomized, controlled trial with different durations. *Liver Gullbladder Pancrease* 23: 1065-1079, 1991.
 29. Koch JO, Lohmann V, Herian U, and Bartenschlager R: In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 protease by the NS4A cofactor. *Virology* 221: 54-66, 1996.
 30. Bouffard P, Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Roberts N, and Jacobsen H: An in vitro assay for hepatitis C virus NS3 serine protease. *Virology* 209: 52-59, 1995.
 31. Miller RH, Purcell RH: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci* 87: 2057-2061, 1990.
 32. Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, Yap PL, Simmonds P: Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 73: 1131-1141, 1992.
 33. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, McIntyre N, Simmonds P: Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19: 13-18, 1994.
 34. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura J, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364, 1989.
 35. Weiner AJ, Kuo G, Bradley D, Bonino F, Saraso G, Lee C, Rosenblatt T, Choo QL, Houghton MH: Detection of hepatitis C viral sequence in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 335: 1-3, 1990.
 36. Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeier G, Nelles M, Lee S, Page E, Wilber J, Polito A: Increased detection of hepatitis C virus (HCV) enzyme immunoassay. *Transfusion* 32: 805-813, 1992.
 37. Courouce AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, and Simon N: Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion* 34: 790-795, 1994.
 38. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, and Vermeylen C: Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 66: 122-129, 1994.
 39. Vernelen K, Claeys H, Verhaert H, Volckaerts A, and Vermeylen C: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 343: 853, 1994.
 40. Courouce AM, Bouchardeau F, Girault A, and Le Marrec N: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 343: 853-854, 1994.
 41. Goffin E, Pirson Y, Cornu C, Jadoul M, and van Ypersele de Strihou C: Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV an-

- tibody. *Lancet* 343: 854, 1994.
42. Quiroga JA, Martin J, Pernas M, Pardo M, Herrero M, Castillo I, Bartolome J, and Carreno V: Evidence of subtype-specific antibodies to antigenic epitopes in the NS5 region of hepatitis C virus in the circulation of patients with chronic hepatitis C. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 545-551, 1994.
 43. Zhang ZX, Chen M, Sonnerborg A, and Sallberg M: Antigenic structure of the complete nonstructural (NS) 2 and 5 proteins of hepatitis C virus (HCV): anti-HCV NS2 and NS5 antibody reactivities in relation to HCV serotype, presence of HCV RNA, and acute HCV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 290-294, 1994.
 44. Kanesaki T, Kinoshita S, Tsujino G, Yoshioka K, and Ikegami N: Hepatitis C virus infection in children with hemophilia: characterization of antibody response to four different antigens and relationship of antibody response, viremia, and hepatic dysfunction. *J Pediatr* 123: 381-387, 1993.
 45. Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M: Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci* 91: 11022-11026, 1994.
 46. Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S: Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190: 894-899, 1992.
 47. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3392-3396, 1991.
 48. Tanaka T, Kato N, Nakagawa M, Ootsuyama Y, Cho MJ, Nakazawa T, Hijikata M, Ishimura Y, Shimotohno K: Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier: sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Res* 23: 39-53, 1992.
 49. Iino S, Hino K, Kuroki T, Suzuki H, Yamamoto S: Treatment of chronic hepatitis C with high-dose interferon -2b. *Dig Dis Sci* 38: 612-618, 1993.
 50. Trepo C, Habersetzer F, Bailly F, Berby F, Pichoud C, Berthillon P, Vitvitski L: Interferon therapy for hepatitis C. *Antiviral Research* 24: 155-163, 1994.
 51. Hosein B, Fang CT, Popovski MA, Ye J, Zhang M, Wang CY: Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3647-3651, 1991.
 52. Shin Soon C, Park Jang H, Kim Ki T, Lee Jeong H, Na Kyu H, Kim Chae Y, Lee Mi Y, Kim Byong M and Kim Won B: Expression and Purification of Korean Type Hepatitis C Virus Core, Nonstructural Protein NS3 in *Escherichia Coli*. *J Kor Soc Virology* 25: 119-127, 1995.
 53. Rosa C, Osborne S, Garetto F, Griva S, Rivella A, Calabresi G, Guaschino R, Bonelli F: Epitope mapping of the NS4 and NS5 gene products of hepatitis C virus and the use of a chimeric NS4-NS5 synthetic peptide for serodiagnosis. *J Virol Methods* 55: 219-232, 1995.
 54. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follet EA, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 52: 884-892, 1994.
 55. Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, McOmish F, Dow BC, Follett EA, Yap PL, Marsden H: Mapping of serotype-specific, immunodominant epitope in the NS4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1,2 and 3. *J Clin Microbiol* 31: 1493-1503, 1993.