

## C형 간염바이러스(HCV)의 NS5B RNA Replicase에 의해 그 활성이 조절되는 HCV 지놈 표적 Hammerhead 리보자임 개발

이창호 · 이성욱\*

단국대학교 자연과학부 분자생물학전공 나노센서 바이오텍 연구소

C형 간염바이러스(hepatitis C virus; HCV) 증식을 효과적이며 특이적으로 제어할 수 있는 유전산물을 개발하기 위하여 HCV 증식조절인자인 NS5B RNA replicase 존재에 의해 allosteric하게 그 활성이 조절될 수 있는 HCV internal ribosome entry site (IRES) 표적 hammerhead 리보자임을 개발하였다. 우선 HCV IRES 염기서열 중 +382 nucleotide (nt) 부위가 리보자임에 의해 가장 잘 인식되었음을 관찰하였다. 이러한 allosteric 리보자임은 NS5B RNA replicase와 특이적으로 결합하는 RNA aptamer 부위, aptamer와 NS5B와의 결합에 의해 리보자임 활성을 유도할 수 있도록 구조적 변이를 전달할 수 있는 communication module 부위 및 HCV IRES의 +382 nt를 인지하는 hammerhead 리보자임 등으로 구성되도록 설계하였다. 특히 *in vitro* selection 기법을 활용하여 NS5B 의존적으로 리보자임 활성을 증가시킬 수 있는 communication module 염기서열을 밝혀내었다. 이러한 리보자임은 단백질이 없거나 대조 단백질인 bovine serum albumin이 존재할 때에는 절단반응을 유도하지 못하였으나 HCV NS5B 단백질이 존재할 때에만 효과적으로 NS5B 농도 의존적으로 절단 반응을 유도할 수 있음을 관찰하였다. 이러한 allosteric 리보자임은 HCV 증식의 효과적인 증식 억제 선도물질 뿐만 아니라 HCV 치료선도물질의 스크리닝용 도구 및 HCV 조절 인자를 탐색할 수 있는 HCV 진단용 리간드로서도 활용될 수 있을 것이다.

**Key words** □ allosteric ribozyme, communication module, hammerhead ribozyme, HCV IRES, Hepatitis C virus, RNA aptamer

C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus; HCV)는 *Flaviviridae* 속 에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스로 non-A, non-B 간염을 일으키고(22), 만성으로 진행되면 간경화나 간암으로 발전되어 치사율이 매우 높은 것으로 알려져 있다(29). 전세계 인구의 1~2%가 이 바이러스에 감염되어 있지만 이 바이러스는 매우 낮은 titer로 생체 내에 존재하고 있기 때문에 진단하기가 매우 힘들었다. 또한 세포 배양 시스템도 미비하였으나 최근 subgenomic 및 genomic HCV replicon이 개발되어 세포 내에서의 HCV 복제기전 및 항 HCV 제제의 스크리닝 또는 항바이러스 효과를 시험할 수 있는 중요한 시스템으로 이용되고 있다(23). 그러나 아직 이 바이러스에 대한 효과적인 치료제나 백신이 없는 상태이며 따라서, 이 바이러스를 억제할 수 있는 물질의 개발이 시급한 상황이다.

HCV 지놈은 약 9.5 kilobase의 크기로 이루어져 있으며 3,010에서 3,030개의 아미노산으로 이루어진 한 개의 복합 단백질이 만들어지는데(8), 바이러스 감염 후 생성되는 이러한 복합 단백질은 이후에 숙주와 바이러스의 proteases에 의해 가공되어, C, E1, E2등의 구조 단백질과 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B등과 같은 증식에 필요한 조절 단백질로 만들어 진다(9).

이 바이러스가 복제하는데 있어 5' untranslated region (UTR)과 3'UTR이 매우 중요한 역할을 할 것으로 예상되는데 5'UTR의 경우 HCV strain들에서 매우 보존되어 있는 internal ribosome entry site (IRES)를 갖고 있어 cap-independent하게 번역과정이 일어나며(1, 20), 3'UTR은 짧으나 보존되어 있지 않은 다양한 염기서열과 여러 길이의 polypyrimidine 트랙 그리고 3'X라 불리는 96개의 염기서열로 구성되어 있어 여기에 복제 복합체가 결합하여 RNA 지놈 복제를 개시할 것으로 예상하고 있다(2). HCV는 양성 단일 가닥이므로 자신의 지놈을 복제하기 위해서는 크게 두 단계과정을 거치는데 먼저 상보적인 음성 단일 가닥을 합성하고 이것을 주형으로 이용하여 지놈을 합성하게 된다. HCV에 의해 합성되는 단백질 중 하나인 NS5B는 RNA replicase로서의 활성을 가지고 있어 바이러스의 복제에 중요한 역할을 하기에(6, 16) 항 HCV 제제를 개발하는데 주요 표적이 되고 있다. 현재 이러한 HCV 증식을 억제하여 HCV 감염에 의한 질병에 어느 정도 효과를 보고 있는  $\alpha$ -interferon을 이용한 방법과 ribavirin을 동시에 투여하는 방법은 바이러스의 strain마다 그 효과가 다르게 보고되어 있으며 단지 40%의 HCV 감염환자에서만 지속적인 효과를 보여 준다고 알려져 있다(13, 25).

새로운 항 HCV 제제로서 최근 활발히 개발되고 있는 산물로써 siRNA (7, 18), RNA aptamer (4, 15), antisense oligonucleotide (11), 리보자임(24, 28, 30) 등의 RNA 분자를 기반으로 한 저해제가 있다. 특히 RNA 분자는 매우 특이적으로 표적분자와 반응

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-31-8005-3195, Fax: 82-31-8005-4058  
E-mail: SWL0208@dankook.ac.kr

할 수 있으므로 side effect 또는 HCV 돌연변이들의 출몰 등을 억제할 수 있고 세포 내에서의 발현시 RNA 자체에 대한 면역 반응은 아직 보고된 바 없는 장점들을 갖고 있다. 또한 RNA는 화학적 합성 및 변형이 용이하고 또한 세포 내 과발현이 용이한 장점이 있다. 그러나 각각의 방법 단일만을 이용할 시에는 그 특이성과 효능에 있어 한계가 있기에 보다 특이적이며 효과적인 항 HCV 제제를 발굴하기 위해선 HCV가 감염된 경우에서만 효과적으로 HCV 증식을 억제할 수 있도록 상기의 유전산물의 기능이 결합된 새로운 산물의 개발이 필요할 것이다.

본 연구에서는 aptamer의 가역적인 표적 분자 인지 능력 및 표적 분자의 활성 억제 능력을 hammerhead 리보자임의 비가역적인 표적 RNA 절단 능력과 결합하여 새로운 개념의 항 HCV 억제제를 개발하고자 하였다. 이러한 새로운 개념의 RNA 분자를 개발하기 위해 우선 HCV의 IRES 염기서열 중 어느 부위가 가장 hammerhead 리보자임에 의해 반응이 용이한 부위인지 탐색하였다. 이러한 HCV IRES 표적 hammerhead 리보자임을 HCV NS5B 단백질에 특이적으로 결합하는 NS5B aptamer와 결합하였으며, aptamer와 표적분자의 결합에 의해 allosteric하게 hammerhead 리보자임의 활성을 증진시킬 수 있는 communication module 염기서열을 *in vitro* selection 방법(19, 27, 31, 33)을 통해 선별함으로써 NS5B 단백질이 존재할 시에만 그 활성이 증가되는 allosteric 리보자임을 개발하였다. 선별된 리보자임들의 활성을 검증하기 위해 *in vitro* cleavage assay 실험을 하였으며 이러한 실험을 통해 선별된 리보자임들이 HCV NS5B 단백질 특이적이며 농도 의존적으로 allosteric하게 self-cleavage 반응을 유도한다는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 기질 RNA 및 hammerhead 리보자임 제작

리보자임의 표적 RNA인 HCV IRES RNA를 제작하기 위하여 HCV IRES의 +18 nucleotide (nt) 부위부터 +402 nt 부위까지 포함되어 있는 DNA [pSK(-) 18-402 IRES CAT] plasmid를 *Bam*HI으로 선형화한 후 T7 RNA 중합효소(Takara, Otsu, Japan)와 37°C에서 3시간 동안 반응하여 *in vitro* 상에서 전사반응을 수행하였다. 이 때 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP를 이용하여 제작된 RNA를 방사선 동위원소로 표지한 후 정제 및 정량하였다.

HCV IRES의 +195 nt, +199 nt, +326 nt 및 +382 nt 부위를 표적하는 hammerhead 리보자임들(각각 Rib195, Rib199, Rib326, Rib382로 명기)을 제작하기 위하여 다음과 같은 primer set를 이용하여 PCR을 수행 한 후 증폭된 DNA 기질과 T7 RNA 중합효소를 37°C에서 3시간 동안 반응하여 *in vitro* 상에서 전사반응을 수행하였다.

Rib195: 5' primer, 5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GTCCAAGACTGATGAG; 3' primer, 5'-GGGTCCITTCGGCCTAACGGCCTCATCAGTCTTGGA

Rib199: 5' primer, 5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGG TTAATCCCTGATG; 3' primer, 5'-CCTTTCITTCGTCCTCACG

GACTCATCAGGGATTAACCT

Rib326: 5' primer, 5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GCACGGTCTACGACTGATG; 3' primer, 5'-GCCCCGGGAG GTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGTCGTAGAC

Rib382: 5' primer, 5'-ACGCGTCGACTAATACGACTCACTA TAGGTTGGTGTCTGATG; 3' primer, 5'-CCAAACGTTTCGTCC TCACGGACTCATCAGACACCAACC

### 리보자임의 *trans*-cleavage 반응

10 mM Tris-Cl (pH 7.5)에 200 fmole의 hammerhead 리보자임을 섞은 후 95°C에서 1분 30초 동안 변성 시킨 후 37°C에서 15분 동안 구조를 재형성 시켰다. 각 리보자임과 20 fmole의 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP로 표지된 HCV IRES RNA와 10 mM MgCl<sub>2</sub>를 섞은 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. 반응이 끝난 RNA는 RNA loading dye를 섞은 후 95°C에서 변성시켜 7 M urea-6% polyacrylamide gel에서 180 V로 1시간동안 전기영동하고 X-선 필름에 3~24시간 노출하여 현상하였다.

### HCV NS5B 단백질 추출

pcp11-NS5B 세포주를 5 ml LB배지에 접종한 후 37°C에서 16~18시간 세포들을 키웠다. 500 ml에 위의 5 ml 을 접종시켜 OD 값이 0.6에서 0.8이 될 때까지 37°C에서 3시간을 키웠다. 여기에 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 IPTG (Sigma, St. Louis USA)를 첨가한 후 37°C에서 3시간을 키운 후 세포의 용해 과정과 초음파 분해 과정을 거친 세포 추출물을 Ni-NTA agarose bead (Qiagen, Valencia USA)와 결합 시킨 후 5시간 동안 4°C에서 NS5B 단백질과 결합시켰다. Ni-NTA agarose bead에 결합되어진 NS5B를 추출하기 위해 imidazole의 농도를 조정해 가며 단백질을 용리 하였다. 농축 고정을 거쳐 Bradford 분석 방법으로 정량하였다.

### HCV NS5B 의존성 allosteric 리보자임 발굴

NS5B 단백질에 의해서 활성이 조절되는 hammerhead 리보자임 발굴을 위해 NS5B에 대한 aptamer와 hammerhead 리보자임 및 무작위 염기서열로 구성된 10 mer의 communication module 을 결합한 리보자임 라이브러리를 제작한 후 *in vitro* selection 방법으로 NS5B 의존성 allosteric 리보자임을 발굴 하였다.

Primer set (5'-TTGGTGTCTGATGAGNNNNNCGCGCCATATTGTGAGGGGCGCG, 5'-TACGTTTGGTTTCCCAAACGTTTCGNNNNNCGCGCCCCTCACAAT; N은 G, A, T, C가 각각 동량 포함)를 넣고 EX *taq* 중합효소 (Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 PCR을 수행하였으며 여기서 얻어진 DNA 산물 20 ng을 primer set (5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTGGTGTCTGATGAG, 5'-TTTTTTTTTTTTTTGGTGTACGTTTGGTTTCCCAA)를 넣고 EX *taq* 중합효소 (Takara, Otsu, Japan)를 사용하여 다시 한 번 더 PCR 하였다. 이렇게 얻어진 라이브러리 DNA를 기질로 하여 T7 RNA 중합효소(Takara, Otsu, Japan)와 3°C에서 3시간 동안 전사반응을 수행함으로써 리보자임 라이브러리를 제작하였다.

NS5B 의존성 allosteric 리보자임 선별을 위해 우선 비특이적으로 self-cleavage되는 RNA를 사전 제거한 후 NS5B에 의해 특이적으로 self-cleavage되는 RNA들을 발굴하였다. 사전 제거 단계로 리보자임 라이브러리 30 pmole을 95°C에서 1분 30초 동안 변성시킨 후 37°C에서 15분간 구조를 재형성 시켰다. 여기에 2× hammerhead 반응 완충용액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 300 mM NaCl, 4 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)과 bovine serum albumin (BSA)을 넣고 37°C에서 6시간 동안 반응시킨 후 7 M urea-10% polyacrylamide gel 전기영동 및 EtBr 염색을 통해 self-cleavage 되지 않은 RNA들을 골라내었다. 사전 단계에서 골라진 RNA를 추출한 후 primer (5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTTGGTG TCTGATGAG)를 이용한 역전사 반응과 primer set (5' primer, 5'-TTGGTGTCTGATGAGNNNNNCGCGCCATATTGTGAGGGG CGCG; 3' primer, 5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTTGGT GTCTGATGAG)를 이용한 PCR 반응을 통하여 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 *in vitro* 상에서 전사반응을 수행한 후 획득한 리보자임 pool을 추출 및 정제하였다. 이렇게 얻어진 RNA 30 pmole을 BSA대신 NS5B를 넣고 사전 제거 단계와 동일한 방법으로 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 7 M urea-10% polyacrylamide gel 상에서 전기 영동하였고, EtBr 염색을 통해 self-cleavage된 RNA들을 골라내어 RT-PCR 과정을 거쳐 두 번째 선별 과정을 거칠 리보자임 pool을 제작하였으며, 이 과정을 3번 반복하였다. 최종 획득한 리보자임 pool을 RT-PCR 수행한 후 그 DNA 산물을 pGEM T easy system (Promega, Madison, USA)을 이용하여 결찰 반응을 시켰으며, *E. coli* (Top10)에 열충격 방법으로 형질 전환 시킨 후 ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) 항생제가 들어 있는 agar plate에서 37°C에서 16시간 동안 배양했다. 형질 전환 되어 agar plate에 자란 각각의 균체 중 수십 개를 선택하여 DNA 정제를 수행하였으며, *EcoRI*을 사용하여 삽입되어 들어간 clone들을 찾아내었다. 찾아내어진 clone DNA에 5× sequencing buffer, terminator ready reaction mixture, 3.2 pmole M13 forward primer 등을 넣은 후, 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4초의 조건으로 25 cycle의 PCR을 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물에 template suppression reagent를 넣어주고, 변성 과정을 거쳐 염기 서열 분석 기계(ABI PRISM, Foster City, USA)에 넣어서 염기 서열을 결정하였다.

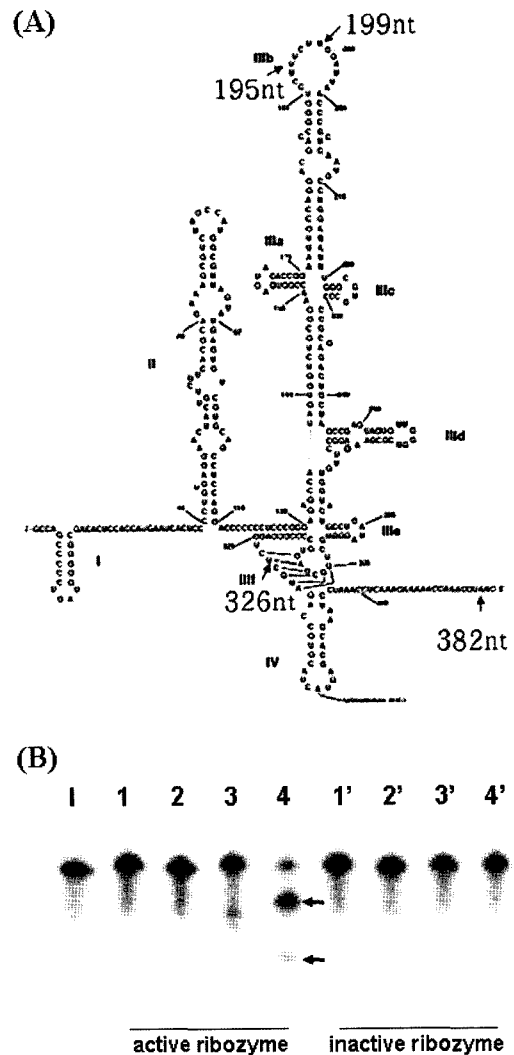
**Allosteric 리보자임의 *in vitro* self-cleavage assay**

선별된 각각의 allosteric 리보자임의 특이성을 보기 위해, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP로 표지된 20 fmole의 리보자임을 3.2 pmole의 BSA 단백질 혹은 NS5B 단백질을 첨가하여 반응시켰다. 20 fmole의 리보자임을 95°C에서 1분 30초 동안 변성시킨 후 37°C에서 15분 동안 구조를 재형성시켰다. 여기에 2× hammerhead 반응 완충용액과 3.2 pmole의 단백질을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 효율성 검증을 위해 20 fmole의 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP로 표지된 리보자임을 다양한 농도의 BSA 혹은 NS5B 단백질과 반응시켰다. 반응이 끝난 RNA는 RNA loading dye를 섞은 후 95°C에서 변성시켜 7 M urea-10% polyacrylamide gel에서 180 V로 1시간

동안 전기영동하고 X-선 필름에 3~24시간 노출하여 현상하였으며 정량적 분석을 위해 typhoon 8600을 사용하여 image를 얻은 후 Imagequant TL v2500 program (GE healthcare, Piscataway, USA)을 사용하였다.

**결 과**

**Hammerhead 리보자임에 가장 접근성이 용이한 HCV IRES 부위 선정**

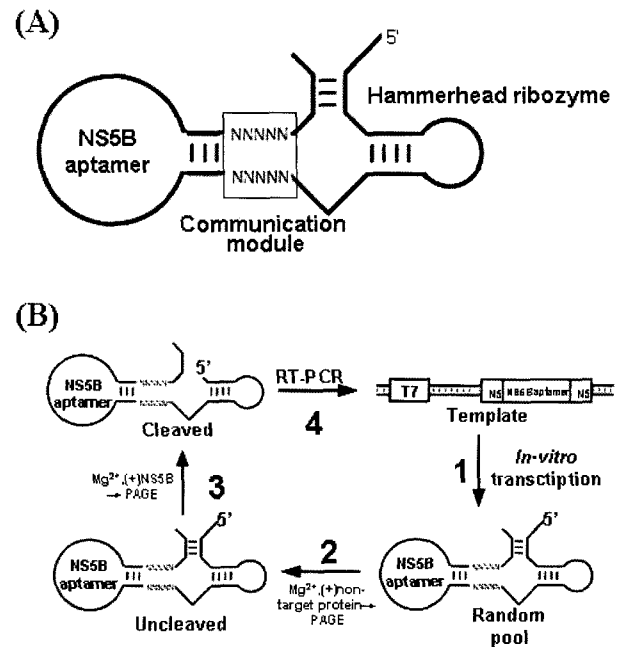


**Fig. 1.** *In vitro* trans-cleavage reaction with variable HCV IRES-targeting hammerhead ribozymes. (A) Predicted secondary structure of HCV IRES (14). Arrows indicate regions targeted by hammerhead ribozymes. (B) Results of *in vitro* trans-cleavage assay with HCV IRES as substrate RNA and IRES 195 nt-targeting (lane 1, Rib195), 199 nt-targeting (lane 2, Rib199), 326 nt-targeting (lane 3, Rib326), or 382 nt-targeting (lane 4, Rib382) ribozyme. Lane I represents input substrate RNA. Arrows indicate cleaved substrate RNA. Inactive ribozyme denotes reaction results with catalytically disturbed ribozyme of each IRES-targeting ribozyme.

HCV IRES는 복잡한 2차 구조를 가지고 있기 때문에(Fig. 1A), IRES의 어느 부위가 hammerhead 리보자임에 가장 접근성이 용이한 부위인지 찾아가 하였다. 195, 199, 326, 382번째 nt를 표적하는 야생형의 hammerhead 리보자임을 제작하였다. 각 부위를 표적하는 hammerhead 리보자임과 방사성 동위원소로 표지된 IRES를 이용하여 *in vitro trans-cleavage assay*를 수행해 본 결과 IRES의 382번째 nt 부위가 hammerhead 리보자임에 가장 접근성이 용이함을 알 수 있었다(Fig. 1B).

**In vitro selection 방법을 통한 NS5B 의존성 allosteric 리보자임 발굴**

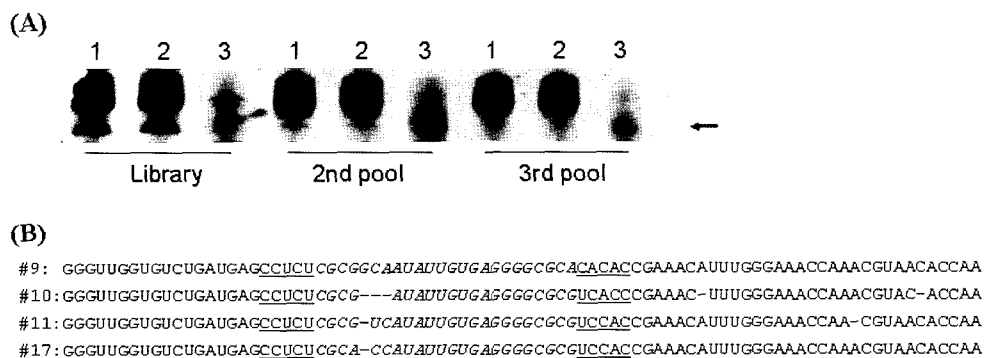
HCV IRES의 382번째 nt를 인지하는 hammerhead 리보자임을 기본 골격으로 한 allosteric 리보자임을 선별하였다. 이를 위해 hammerhead 리보자임의 catalytic core 부위인 stem II부위에 communication module을 통해 NS5B aptamer를 결합시킴으로써, NS5B 단백질의 aptamer 결합이 리보자임의 catalytic 과정을 조절 할 수 있는 리보자임을 *in vitro selection* 방법을 통하여 발굴하였다. 무작위의 10 mer로 구성된 communication module을 NS5B와 hammerhead 리보자임의 사이에 삽입하여 NS5B 의존성 self-cleavage allosteric 리보자임 라이브러리를 제작하였다(Fig. 2A). 이렇게 제작된 random 라이브러리를 Fig. 2B의 전략으로 *in vitro selection*을 수행하였다. 우선 non-regulatable pool의 완벽한 제거를 위하여 리보자임 라이브러리를 BSA 단백질과 반응시켜 cleavage 되지 않은 RNA들을 선별함으로써 비특이적으로 cleavage되는 RNA pool을 제거하였다. 이렇게 골라진 RNA들을 RT-PCR을 통해 증폭하고 *in vitro* 전사반응을 통해 RNA pool을 제작한 후 다음 selection 과정을 진행하였다. NS5B에 의해 조절될 수 있으며 fast reaction pool 선별을 위하여 획득한 RNA pool을 NS5B 단백질과 반응시킨 후 특이적으로 잘린 RNA만을 선별하여 다시 RT-PCR 과정을 거쳤다. 이러한 과정을 3회 수행한 후 리보자임 라이브러리와 2차 pool 및 3차 pool 리보자임을 이용하여 enrichment 정도를 확인한 결과 3차 pool 리보자임이



**Fig. 2.** Scheme for the development of NS5B-dependent allosteric ribozymes. (A) Composition and structure of allosteric ribozyme which activity is regulated by HCV NS5B protein. (B) *In vitro* selection scheme to identification of communication module sequence.

BSA와 반응 시켰을 때 잘리지 않고, NS5B protein과 반응 시켰을 때만 특이적으로 잘리는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3A).

3차 selection 후 획득한 리보자임 pool을 RT-PCR 방법을 통해 증폭한 후 cloning하여 염기 서열을 결정하였다. 그 결과 4종류의 리보자임이 선별되었다(Fig. 3B). 흥미롭게도 clone 10, 11, 17의 경우 NS5B aptamer의 stem 부위에 돌연변이가 유발되었는데 이는 각 리보자임들의 aptamer에 NS5B가 결합하는 데에는



**Fig. 3.** Identification of allosteric ribozymes. (A) *In vitro* self-cleavage assay using each pool of ribozyme selected from ribozyme library. NS5B-dependent *in vitro* self cleavage assay is performed with library, 2nd pool ribozyme RNA and 3rd pool ribozyme RNA. Each RNA pool is incubated in the absence of any proteins (lane 1) or in the presence of BSA (lane 2) or NS5B (lane 3). An arrow represents the self-cleaved RNA pool. (B) Sequence of *in vitro* selected allosteric ribozymes. Sequences underlined denote selected communication module regions. Italicized sequences represent aptamer sequences to HCV NS5B.

영향을 끼치지 않으면서 NS5B 결합에 의한 리보자임 활성화 유도가 최적화되는 구조를 이루도록 염기서열에 변이가 일어났을 것으로 추정된다.

### Allosteric 리보자임의 특이성 및 효율성 검증

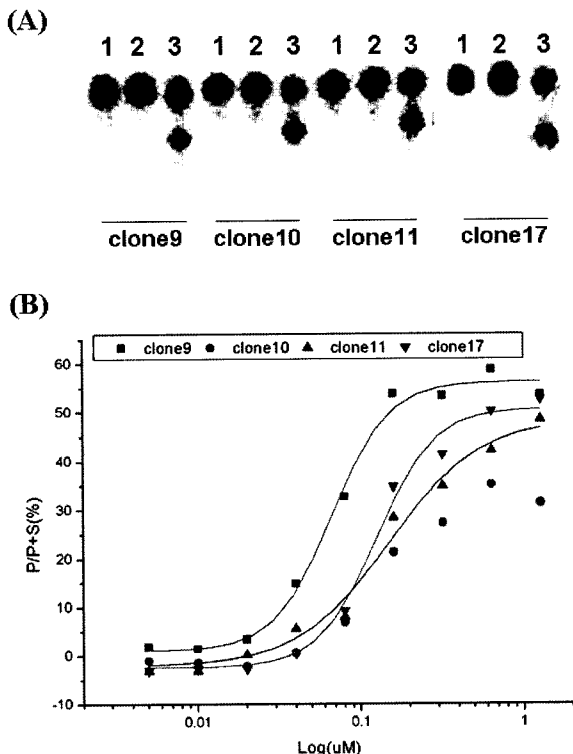
선정된 4개의 리보자임이 과연 NS5B가 존재하는 경우에만 특이적으로 self-cleavage 활성이 유도될 수 있는지 검증하기 위하여 방사성 동위원소로 표지된 각각의 리보자임을 BSA 혹은 NS5B 단백질과 반응시켰다. 그 결과 4개의 리보자임에서 모두 단백질이 없거나 BSA가 존재 시에는 아무런 반응이 유도되지 못하였으나 NS5B가 존재 시엔 특이적으로 self-cleavage 반응이 유도되었다(Fig. 4A). 이러한 반응이 NS5B 단백질에 의한 비특이적 분해가 아님을 검증하기 위해 동일한 반응을 hammerhead 리보자임 활성화의 co-factor인  $Mg^{2+}$ 가 없는 완충용액 조건에서 실행해 본 결과, NS5B만 존재할 경우 특이적 cleavage 부위가 아닌 비 특이적 부위에서 cleavage가 유도되었다(결과 미제시). 이는 allosteric 리보자임의 특이적 활성화에  $Mg^{2+}$ 와 NS5B 단백질이 모두 필요하며, NS5B가 선별된 리보자임의 정확한 구조 형성

및 활성화유도에 중요함을 시사한다.

4종류의 리보자임의 효율성 검증을 위해 각각에 대해 단백질 농도별 cleavage 산물을 확인하였다. 방사성 동위원소로 표지된 20 fmole의 각 리보자임을 최소 5 nM에서 최대 1.28 mM까지의 NS5B 단백질과 반응 시켜 보았다. 그 결과, 모든 리보자임들이 단백질 농도가 증가되면서 self-cleavage 반응이 증가되었으며 NS5B 농도 증가에 따라 sigmoid curve 형태를 나타내었다(Fig. 4B). NS5B 존재시 cleavage 효율이 최대 50~60%(clone 9의 경우)까지 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으나 BSA의 경우는 단백질 농도에 상관없이 cleavage가 전혀 일어나지 않았다(결과 미제시).

### 고 찰

RNA는 구조적으로 dynamic한 특성을 함유하고 있으므로 항 HCV를 위한 RNA 기반 억제제들을 융합하여 새로운 구조적 특성, 나아가 새로운 기능을 가진 새로운 유전 산물을 개발함으로써 각각 단독으로만 존재시 갖고 있던 약점들을 극복할 수 있는 새로운 항 HCV 제제를 개발할 수 있을 것이다. 최근 리보자임의 기질 결합 부위 또는 catalytic core부위에 aptamer와 같이 특정 ligand와 결합하는 부위를 join시 특정 ligand의 결합에 의해 리보자임 구조적 변이를 유발함으로써 리보자임 활성이 allosteric하게 증가 또는 저해될 수 있는 allosteric 리보자임이 개발되고 있다(3, 26). 본 연구에서는 HCV의 비구조 단백질인 NS5B에 대한 aptamer를 hammerhead 리보자임의 catalytic core 부위에 결합함으로써 NS5B 단백질에 의해 활성이 조절되는 allosteric 리보자임을 개발하였다. 이러한 allosteric 리보자임은 aptamer의 가역적인 표적 결합 능력과 hammerhead ribozyme의 비가역적인 표적 RNA에 대한 cleavage 활성이 더해진 새로운 개념의 항 HCV 억제제로서 사용 가능할 것이다. 이러한 리보자임의 개발을 위하여 NS5B 단백질과 NS5B aptamer와의 binding energy를 hammerhead 리보자임의 cleavage 활성으로 전환해 줄 수 있는 communication module 염기서열을 무작위화 하였으며, 여기서 얻어진 pool을 이용하여 *in vitro* selection 방법을 3회 수행, NS5B에 의해서 특이적으로 활성을 가지는 리보자임을 개발하였다. 발굴된 리보자임들의 특이성을 검증해 본 결과, NS5B가 존재시에만 특이적인 반응을 통해서 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 개발된 리보자임을 활용하여 HCV에 감염된 경우에만 HCV가 발현하는 NS5B에 의해 리보자임 활성이 유도됨으로써 HCV 증식을 특이적으로 억제할 수 있음을 시사한다. 이는 혹 있을지 모르는 리보자임의 비특이적인 off-target 효과를 최소화할 수 있는 장치가 될 수 있을 것이다. Allosteric 리보자임 활성화의 co-factor인  $Mg^{2+}$ 를 제거했을 경우, NS5B 존재시 비특이적 위치에서 cleavage가 일어나는 것을 확인하였다. 보고에 따르면,  $Mg^{2+}$ 는 hammerhead 리보자임의 stem I과 III 구조가 형성된 후 이 두 stem과 stem II junction 부위에 결합하여 리보자임을 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(10). 보고된 바에 비추어 볼 때 정확한 구조 형성을 만들어주지는 못하지만, NS5B



**Fig. 4.** NS5B-dependent cleavage reaction of the selected ribozymes. (A) To test specificity of each selected ribozyme, self-cleavage assay is performed in the absence of any proteins (lane 1) or in the presence of BSA (lane 2) or NS5B protein (lane 3). (B) NS5B concentration-dependent self-cleavage reaction of allosteric ribozymes. Each ribozyme was incubated with increasing amounts of HCV NS5B protein, and the fraction of cleaved products in each reaction was calculated and plotted.

단백질 자체가  $Mg^{2+}$ 와 비슷한 역할을 하는 것으로 보이며, NS5B에 의해 리보자임의 구조에 변화가 생기면 그 변한 구조에  $Mg^{2+}$ 가 결합하여 allosteric 리보자임의 정확한 구조 형성 및 활성을 가지도록 해줌을 유추 할 수 있다. 즉 리보자임의 특이적 활성을 위한 구조의 형성을 위해선 NS5B와  $Mg^{2+}$ 가 반드시 필요할 것이다.

본 연구에서 개발한 NS5B 의존성 리보자임을 항 HCV 제제로서 활용하기 위해선 이러한 리보자임이 과연 기질 RNA와 *trans* 하개도 cleavage 반응을 NS5B 특이적으로 유도할 수 있는지 검증하여야 할 것이다. 그러나 본 연구로부터 개발된 self-cleavage 리보자임은 HCV 감염을 진단 할 수 있는 리보스위치 개념의 biosensor로서(5, 12, 32) 사용이 가능할 것이다. 또한 self-cleavage 리보자임을 NS5B 단백질에 의해 HCV 증식에 주요한 숙주인자인 miR-122에 대한 anti-sequence를 release하게 만든다면 HCV 복제를 저해 할 수 있을 뿐 아니라(17, 21), aptamer의 NS5B 단백질 결합에 의해서도 HCV 복제를 감소시킬 수 있어 하나의 분자를 사용한 치료법보다 더 뛰어난 효과를 보일 수 있을 것이라 전망된다. 또한 이러한 allosteric ribozyme을 NS5B 단백질 의존적으로 면역 유도성 RNA들을 release하게 만든다면 HCV에 감염된 세포의 면역력을 높임으로써 HCV의 감염 역시 저해 할 수 있어 새로운 개념의 항 HCV 저해제로서 사용될 수 있을 것이며, 아직 많은 부분이 밝혀져 있지 않은 HCV 복제 과정을 연구할 수 있는 도구로서도 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 말

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-041-C00296).

## 참고문헌

1. Ali, N. and A. Siddiqui. 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* 69, 6367-6375.
2. Anwar, A., N. Ali, R. Tanveer, and A. Siddiqui. 2000. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J. Biol. Chem.* 275, 34231-34235.
3. Araki, M., Y. Okuno, Y. Hara, and Y. Sugiura. 1998. Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change. *Nucleic Acids Res.* 26, 3379-3384.
4. Biroccio, A., J. Hamm, I. Incitti, R. De Francesco, and L. Tomei. 2002. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 76, 3688-3696.
5. Breaker, R.R. 2002. Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 31-39.
6. Cheng, J.C., M.F. Chang, and S.C. Chang. 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J. Virol.* 73, 7044-7049.
7. Chevalier, C., A. Saulnier, Y. Benureau, D. Flchet, D. Delgrange, F. Colbre-Garapin, C. Wychowski, and A. Martin. 2007. Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. *Mol. Ther.* 15, 1452-1462.
8. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
9. Hahm, B., D.S. Han, S.H. Back, O.K. Song, M.J. Cho, C.J. Kim, K. Shimotohno, and S.K. Jang. 1995. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J. Virol.* 69, 2534-2539.
10. Hammann, C. and D.M. Lilley. 2002. Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *ChemBiochem.* 3, 690-700.
11. Hanecak, R., V. Brown-Driver, M.C. Fox, R.F. Azad, S. Furusako, C. Nozaki, C. Ford, H. Sasmor, and K.P. Anderson. 1996. Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J. Virol.* 70, 5203-5212.
12. Hartig, J.S., S.H. Najafi-Shoushtari, I. Grune, A. Yan, A.D. Ellington, and M. Famulok. 2002. Protein-dependent ribozymes report molecular interactions in real time. *Nat. Biotechnol.* 20, 717-722.
13. Hino, K., S. Sainokami, K. Shimoda, S. Iino, Y. Wang, H. Okamoto, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. 1994. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 42, 299-305.
14. Honda, M., M.R. Beard, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1999. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J. Virol.* 73, 1165-1174.
15. Hwang, B., J.S. Cho, H.J. Yeo, J.H. Kim, K.M. Chung, K. Han, S.K. Jang, and S.W. Lee. 2004. Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus. *RNA* 10, 1277-1290.
16. Johnson, R.B., X.L. Sun, M.A. Hockman, E.C. Villarreal, M. Wakulchik, and Q.M. Wang. 2000. Specificity and mechanism analysis of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 129-134.
17. Jopling, C.L., M.K. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309, 1577-1581.
18. Kapadia, S.B., A. Brideau-Andersen, and F.V. Chisari. 2003. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 2014-2018.
19. Kertsburg, A. and G.A. Soukup. 2002. A versatile communication module for controlling RNA folding and catalysis. *Nucleic Acids Res.* 30, 4599-4606.
20. Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*. *J. Virol.* 74, 2046-2051.
21. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K.G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel. 2005. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689.
22. Kuo, G., Q.L. Choo, H.J. Alter, G.L. Gitnick, A.G. Redeker, R.H. Purcell, T. Miyamura, J.L. Dienstag, M.J. Alter, and C.E. Stevens. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362-364.
23. Lohmann, V., F. Korner, J.O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.

24. Macejak, D.G., K.L. Jensen, S.F. Jamison, K. Domenico, E.C. Roberts, N. Chaudhary, I. von Carlowitz, L. Bellon, M.J. Tong, A. Conrad, P.A. Pavco, and L.M. Blatt. 2000. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 31, 769-776.
25. Pagliaro, L., A. Craxi, C. Cammaa, F. Tine, V. Di Marco, L. Iacono, and P. Almasio. 1994. Interferon-alpha for chronic hepatitis C: an analysis of pretreatment clinical predictors of response. *Hepatology* 19, 820-828.
26. Penchovsky, R. and R.R. Breaker. 2005. Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nat. Biotechnol.* 23, 1424-1433.
27. Roth, A. and R.R. Breaker. 2004. Selection *in vitro* of allosteric ribozymes. *Methods Mol. Biol.* 252, 145-164.
28. Ryu, K.J., J.H. Kim, and S.W. Lee. 2003. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol. Ther.* 7, 386-395.
29. Saito, I., T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji, Y. Ohta, Q. Choo, M. Houghton, and G. Kuo. 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6547-6549.
30. Sakamoto, N., C.H. Wu, and G.Y. Wu. 1996. Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J. Clin. Invest.* 98, 2720-2728.
31. Tuerk, C. and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
32. Vaish, N.K., F. Dong, L. Andrews, R.E. Schweppe, N.G. Ahn, L. Blatt, and S.D. Seiwert. 2002. Monitoring post-translational modification of proteins with allosteric ribozymes. *Nat. Biotechnol.* 20, 810-815.
33. Zivarts, M., Y. Liu, and R.R. Breaker. 2005. Engineered allosteric ribozymes that respond to specific divalent metal ions. *Nucleic Acids Res.* 33, 622-631.

(Received August 22, 2007/Accepted September 9, 2007)

---

**ABSTRACT : Development of Hepatitis C Virus (HCV) Genome-Targeting Hammerhead Ribozyme Which Activity Can Be Allosterically Regulated by HCV NS5B RNA Replicase**

**Chang Ho Lee and Seong-Wook Lee\*** (Department of Molecular Biology and Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin 448-701, Korea)

For the development of basic genetic materials for specific and effective therapeutic approach to suppress multiplication of hepatitis C virus (HCV), HCV internal ribosome entry site (IRES)-targeting hammerhead ribozyme which activity is allosterically regulated by HCV regulatory protein, NS5B RNA replicase, was developed. The ribozyme targeted most effectively to +382 nucleotide (nt) site of HCV IRES RNA. The allosteric ribozyme was designed to be composed of sequence of RNA aptamer to HCV NS5B, communication module sequence which can transfer structural transition for inducing ribozyme activity upon binding NS5B to the aptamer, and sequence of ribozyme targeting +382 nt of HCV IRES. Noticeably, we employed *in vitro* selection technology to identify the most appropriate communication module sequence which can induce ribozyme activity depending on the NS5B protein. We demonstrated that the ribozyme was nonfunctional either in the absence of any proteins or in the presence of control bovine serum albumin. In sharp contrast, the allosteric ribozyme can induce activity of cleavage reaction with HCV IRES RNA in the presence of the HCV NS5B protein. This allosteric ribozyme can be used as lead compound for specific and effective anti-HCV agent, tool for highthroughput screening to isolate lead chemicals for HCV therapeutics, and ligand for biosensor system for HCV diagnosis.