Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 36, No. 4, 353–359(2008)

C형 간염 바이러스 NS5B 단백질과 숙주의 p48 단백질의 상호작용에 의한 인터페론 저항성의 유도

박소연 · 이종호 · 명희준*
한국외국어대학교 생명공학과

An Interferon Resistance Induced by the Interaction between HCV NS5B and Host p48. Park, So-Yeon, Jong-Ho Lee, and Heejoon Myung*. *Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies* – Hepatitis C virus (HCV) is known as the causative agent of blood transmitted hepatitis. Two viral proteins, E2 and NS5A, are known to exert interferon resistance of HCV via PKR pathway. Here, we report a third protein, the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of HCV, induced interferon resistance inhibiting p56 pathway. p56 was shown to interact with p48 subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3). This interaction inhibited formation of ternary complex in translation initiation. Using dual reporter assay system, we observed that the translation decreased when interferon alpha was added to the culture. But, in the presence of HCV NS5B, the translation partly recovered. NS5B and p48 subunit of eIF3 were shown to interact. This interaction seems to inhibit the interaction between p48 and p56. This is the first report that a virus exerts interferon resistance via p56 pathway.

Key words: HCV, NS5B, p48, p56, interferon resistance

서 론

Hepatitis C virus(HCV)는 전세계적으로 1억 7천만 명 이상의 인구가 감염되었다고 보고되었으며 일반적으로 숙주의 면역체계를 피해가며 감염된 개인의 70% 이상을 지속적인 감염상태로 유지시킨다. 주로 수혈에 의해 전염되며 감염된 후 만성으로 진행될 경우 간경화나 간암으로까지 발병하는 것으로 보고되고 있다[3, 10]. HCV는 *Flaviviridae* family 내에서 *Hepaticivirus* genus에 속하는 envelope protein을 가진 직경 약 50 nm의 구형 virus이다[7]. Viral genome은 9.6 kb로 이루어진 positive sense single-stranded RNA로 하나의 커다란 open reading frame(ORF)을 포함하며 약 3,010 아미노산으로 구성된 polyprotein을 가지는데 이는 최소한 10개의 protein으로 나뉜다[1, 4, 6, 14]. 이 polyprotein은 발현 후, host와 virus 자신이 encode하는 protease에 의해 processing이 되어 각각의 기능을 수행한다[20, 23]. HCV의 protein은 크게 structural protein과 nonstructural protein으로 구성되어 있으며 genome의 5' end와 3' end에는 고유의 noncoding region이 존재하여 HCV의 replication과 translation에 중요한 역할을 한다. HCV의 ORF 중 C-terminal 부분에 위치하는 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)는 HCV가 자신의 genome을 template로 progeny strands를 합성하는데 필수적인 enzyme이다. 이 replication process를 위해서 NS5B는 HCV RNA의 positive와 negative sense strand 모두를 template로 이용한다[2, 8, 11]. NS5B가 positive strand를 template로 이용할 때는 5'UTR과 interaction을 한다고 알려져 있으며 negative strand를 template으로 할 때는 3'UTR에 binding 한다고 알려져 있다[5, 7, 9, 13, 16, 17]. HCV polyprotein의 translation은 positive strand를 template로 하여 host의 ribosome을 통해 이루어진다. 이때 ribosome이 translation을 시작하기 위해서 HCV의 5'UTR과 core protein의 일부분으로 이루어진 internal ribosome entry site(IRES)에 binding 하며 이는 eukaryotic viral RNA translation에 공통적인 mechanism으로 알려져 있다. HCV의 IRES mediated translation은 cap 이나 다른 viral IRES mediated translation과는 달리 eukaryotic initiation factor들인 eIF4A, eIF4B, eIF4E 혹은 eIF4G 등이 필요하지 않은 것으로 알려져 있으며 반면에 eIF3는 ribosome의 40S complex에 direct하게 binding하여 ribosome-IRES element complex를 stable하게 한다[2, 16]. 최근 연구에서는 HCV IRES에 40S subunit과 eIF3가 specific하게 binding하는 site가 존재한다고 밝혀졌다[11]. Viral infection 시에 가장 많이 사용되는 치료제 중 하나가 IFN이며 아직까지도 IFN에 의한 정확한 치료 mechanism은 밝혀지지 않았다. IFN 투여나 viral infection 시에 cell이 translation을 조절할 때는 2'-5' oligoadenylate synthetase (OAS)/RNase L pathway와 protein kinase R(PKR)-eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit(eIF2α) pathway,

*Corresponding author
Tel: 82-31-330-4098, Fax: 82-31-330-4566
E-mail: hjmyung@hufs.ac.kr

p56-eIF3 pathway를 포함한 적어도 세가지 이상의 cellular pathway가 관여한다고 보고되었다[22]. IFN의 signal pathway를 보면 먼저 viral infection이나 double strand RNA에 의해 IFN이 cell 내에서 분비되고, cell 밖으로 분비된 IFN은 IFN receptor에 결합하여 dimer를 형성한다. 다음으로 Janus Kinase(JAK)에 의해 IFN receptor의 tyrosine residue에 phosphorylation이 되고 signal transducer and activator of transcription(STAT) 1과 2에도 인산화된다. Phosphorylation 된 STAT 1과 2는 nucleus로 translocation 되고 DNA binding protein인 p48과 결합하여 IFN-stimulated gene factor 3(ISGF3)라는 complex를 형성한다. 이 complex는 IFN stimulated genes(ISG)의 IFN stimulated response element(ISRE)에 결합하여 ISG인 OAS와 PKR, p56이 expression 된다. OAS에 의해 RNase L이 activation 되면 28S rRNA를 자르거나 inactivation 시켜 translation을 suppression하게 된다. Viral infection 시에는 PKR이 activation 되는데 PKR은 eIF2α의 51번째 serine에 phosphorylation을 시켜 translation을 저해한다[18]. p56은 viral stress에 의해 유도되는 protein으로 double-stranded RNA와 IFN과 같은 viral stress-inducing agent에 의해 만들어지는 56 KDa의 protein이다. p56은 8개의 tetratricopeptide(TPR) motif를 가지며 이 motif를 이용하여 다른 protein과 interaction을 한다. p56과 interaction을 하는 protein 중의 하나가 eIF3의 p48 subunit이다. IFN에 의해 induction 된 p56이 eIF3의 p48 subunit과 상호작용을 함으로써 cellular translation이 저해된다고 보고되었다[9]. eIF3는 eukaryote의 translation initiation factor 중의 하나로 단백질 합성 시 첫 단계에 작용한다. 현재 HCV infection의 치료를 위해서는 IFN-α를 사용하거나 IFN-α와 nucleoside analogue인 ribavirin을 병용하여 사용하고 있다. HCV infection 시에 IFN은 HCV IRES의 function을 inhibition 함으로써 translation control program을 유도 시킬 것이라 예상하고 있다. 하지만 IFN 치료에 있어 HCV genotype에 따라 그 효과가 다르며 일시적이고 한정된 효과를 보일 뿐만 아니라 부작용을 유발하여 환자의 40~50% 만이 치료 효과를 보고 있을 뿐이다[12, 20, 24]. 이는 IFN에 의해 activation 되어 antiviral activity를 가지는 PKR의 기능을 HCV의 E2 protein이 저해하기 때문이라고 밝혀져 있다. 또한 최근에는 NS5A도 IFN resistance에 연관이 있다고 밝혀졌는데 NS5A의 interferon sensitivity determining region(ISDR)이라 명명된 부분은 일부 strain에서 IFN에 대한 저항성을 갖게 함으로써 IFN therapy를 회피할 수 있게 한다. 이 작용의 정확한 mechanism은 알려져 있지 않지만 NS5A가 IFN-induced protein kinase를 inhibition하는 것으로 보고 되었다[14, 23]. 이와 같은 HCV의 IFN resistance mechanism과 관련하여 본 연구에서는 NS5B가 p56 pathway를 inhibition 함으로써 HCV가 IFN에 resistance를 갖게 될 것이라 예상하였다.

재료 및 방법

Bacterial strains, plasmids 및 cell line

본 실험에 사용된 plasmid를 cloning 하는데 사용된 bacterial strain은 *Escherichia coli* JM109와 DH10B였다. Human hepatoma cell line인 Huh7 cell은 cell culture 상에서 reporter의 translation을 보기 위해 transient transfection에 사용되었다.

Hepatoma cell line culture

Huh7 cell은 37°C의 CO_2 incubator에서 10% fetal bovine serum(Hyclone)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagles Media(DMEM, Gibco BRL)로 키웠으며 cell을 seeding (4×10^5 cell/mL)한 후 4일마다 subculture 하였다. 이 때 1X Trypsin-EDTA(1 L당 8.2 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.14 g Na_2HPO_4, 0.2 g KH_2PO_4, 0.29 g $Na_2EDTA\cdot2H_2O$, 1 g Trypsine, pH 7.35, Gibco BRL)를 37°C에서 2 분간 처리하여 cell을 떼어낸 후 serum이 들어있는 DMEM을 처리하여 trypsin을 불활성화 시켰다. 1200 rpm에서 10분간 원심 분리하여 cell을 가라앉히고 trypsin, DMEM mixture를 제거한 후 다시 serum이 들어 있는 DMEM media로 cell을 풀어주었다. 이중 100 μL를 취하여 Cell 수를 haemocytometer로 세었다.

Plasmid construct의 제작

NS5B gene을 Huh7-replicon cell로부터 얻기 위하여 Huh7-replicon cell을 35 mm dish에 95%가 되게 키웠다. Cell을 1X PBS로 washing한 후에, Trizol reagent®(Invitrogen) 1 mL을 넣고 상온에서 5분간 방치하여 cell을 깨고, chloroform 200 μL를 넣고 섞어준 후 상온에서 3 분간 방치하였다. 4°C, 12,000×g로 15분간 원심 분리하여 상등액 만을 취해 isoprophanol 500 μL로 precipitation하여 total RNA를 얻었다. 여기에 RQ1 DNase®(Promega) 처리를 한 후에 다시 phenol extraction을 하여 sample을 얻어 1 mg의 RNA를 RT reaction에 사용하였다. RNA 1 μg, 2 mM의 primer 1 μL, 10 mM dNTP 1 μL, DEPC DW로 final volume 8 μL가 되도록 넣고 섞어서 65°C에서 5분 동안 incubation 하였다. 곧바로 ice에 2분간 둔 후 master mixture(5X RT buffer, 25 mM $MgCl_2$, 0.1 M DTT, RNase inhibitor (Promega))를 넣고 42°C에서 2분 동안 Pre-incubation한 후에 superscript™II RTase (Invitrogen)를 넣고 42°C 50분, 70°C 15분 동안 incubation 하여 RT를 수행하였다. 여기서 나온 RT product를 template로 하여 Taq polymerase(Promega)를 이용, 94°C 2분 -94°C 30초 50°C 45초 72°C 1분 30초로 30 cycle -72°C 10분으로 PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 primer들은 Table 2에 나와있다. 이렇게 얻어진 PCR product를 pcDNA3의 *Bam*HI, *Eco*RV site에 cloning 하였다. 다시 이 pcDNA-NS5B construct를 temp-

late로 하여 동일 조건으로 PCR을 수행하여 pcDNA4의 *Bam*HI, *Xho*I site에 cloning하여 pcDNA4-NS5B라 명명하였다.

p56 gene을 얻기 위하여 Huh7 cell에 IFN-α(Sigma)를 100 unit이 되도록 처리하였고, 24시간 후에 앞서와 같은 방법으로 cell을 깨서 total RNA를 isolation 하였고 oligoT primer를 이용하여 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR product를 pcDNA3의 *Bam*HI, *Xho*I site에 cloning 하였다.

Rabbit reticulocyte를 이용한 *In vitro* transcription/translation(TNT)과 reporter assay

본 연구에서는 cap dependent translation과 HCV IRES mediated translation에 있어서 IFN의 효과를 보기 위하여 dual luciferase plasmid를 reporter로 하여 assay를 수행하였다. 이 plasmid는 promoter 뒤로 각 gene이 renilla luciferase gene, HCV IRES, firefly luciferase gene 순서로 cloning 되어 있어 translation 시 promoter 바로 뒤에 위치한 renilla luciferase gene은 cap mediated translation이 일어나고 firefly luciferase gene은 바로 앞의 HCV IRES에 의해 translation이 일어난다. Plasmid DNA(total 1.5 μg), 1 mM Methionine 1 μL, rabbit reticulocyte(Promega) 20 μL, nuclease free water를 반응액으로 넣고 30°C에서 90분간 incubation 하였다. 반응액 20 μL에 firefly luciferase substrate(Dual-luciferase® Reporter assay system, Promega)를 80 μL 넣어준 후 luminometer(Packard Fusion)로 delay time 1초, counting time 10초로 하여 firefly luciferase activity를 측정하였으며 측정 후 이 mixture에 바로 Stop & Glo® substrate(Dual-luciferase® Reporter assay system, Promega) 80 μL를 넣고 Renilla luciferase activity를 측정하였다.

Hepatoma cell line으로의 transient transfection과 reporter assay

Transfection 하기 전 날 Huh7 cell을 6 well plate에 well 당 1×10^6 cell로 심고 24시간 후에 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 transfection 하였다. Lipofectamine 2000을 serum free media로 dilution 하여 5분 후 준비한 DNA와 섞어서 상온에 20분 방치하였고 이 mixture를 곧바로 Huh7 cell에 뿌려주었다. DNA는 pR/HCV/F, pcDNA4-NS5B, pcDNA-p56, pcDNA3, pcDNA-GST를 사용하였으며 48시간 후에 assay를 하였다. Well 내의 media를 제거한 후 1X PBS로 wash한 후에 1X passive lysis buffer(Promega)를 각 well당 500 μL씩 넣어준 후 실온에서 15분간 rocking 하였다. Cell lysate 20 μL에 luciferase assay substrate(Dual-luciferase® Reporter assay system, Promega)을 80 μL 넣어준 후 Luminometer (Packard Fusion)로 firefly luciferase activity를 측정하였으며 측정 후 이 mixture에 바로 Stop & Glo® substrate(Dual-luciferase® Reporter assay system, Promega) 80 μL를 넣고 Renilla luciferase activity를 측정하였다.

IFN-α를 처리할 경우에는 transfection을 하고 5시간 후에 IFN-α를 100 unit으로 처리하였고 같은 방법으로 assay를 수행하였다.

Competitive RT-PCR

Competitor가 cloning 되어 있는 plasmid를 *Bam*H I으로 잘라 linear form으로 만들었고, T7 RNA polymerase(promega)를 이용하여 *in vitro* transcription 통해 RNA를 얻었다. 이 RNA를 RT를 수행하여 cDNA를 얻었다. Dual reporter plasmid가 transfection 된 cell을 1X passive lysis buffer로 cell을 깨서 dual luciferase assay를 한 후 남은 sample 300 μL를 가지고 RNeasy® Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 isolation 하였다. 이 RNA를 이용하여 RT를 하였고, 미리 제작한 competitor cDNA와 함께 섞어 PCR을 수행하였다.

Western blot

Dual reporter plasmid가 transfection된 cell을 1X passive lysis buffer로 cell을 깨서 dual luciferase assay를 한 후 남은 sample을 6X loading dye와 섞은 후 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(10% resolving gel, 4% stacking gel) 한 후 nitrocellulose membrane(Millipore)에 electroblotting 하였다. Transfer 후에 membrane을 TBS-T blocking buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% tween-20, 5% nonfat skim milk)에 overnight blocking 하였다. TBS-T buffer를 이용하여 wash한 후에 anti-His tag antibody를 1:5000으로 dilution하여 1시간 동안 primary reaction을 수행하였다. Reaction이 끝난 후 다시 TBS-T buffer를 이용하여 wash한 후에 HRP conjugated anti-mouse antibody를 1:5000으로 dilution하여 1시간동안 secondary reaction을 수행하였다. 반응이 끝난 후 다시 wash하고 Enhanced Chemi-Luminisence(ECL®, Intron)로 detection 하여 X-ray film에 감광하였다.

결과 및 고찰

HCV NS5B와 host p48의 상호작용 확인

HCV의 NS5B 단백질과 host의 p48 단백질의 상호작용함을 먼저 yeast two hybrid library를 검색하여 찾아내었다. 이를 다시 한번 yeast two hybrid assay(Fig. 1A)와 GST pulldown assay를 이용하여 두 단백질의 상호작용을 재확인하였다(Fig. 1B)

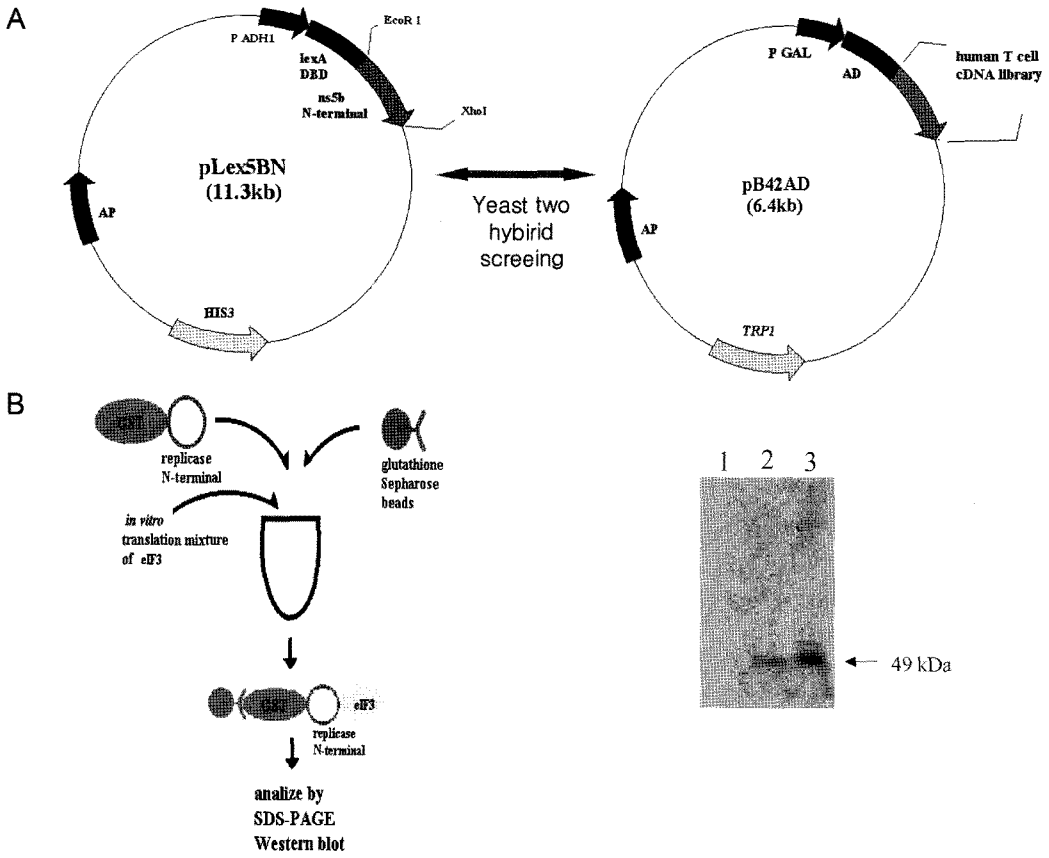
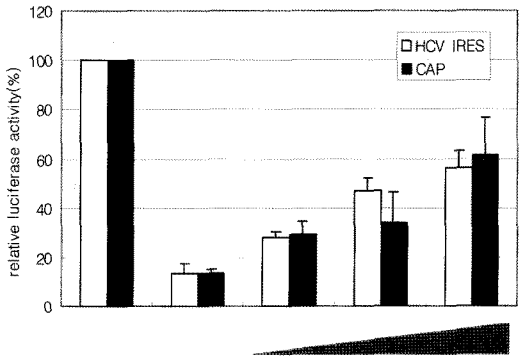


Fig. 1. Interaction of HCV NS5B and host p48. Scheme of yeast two hybrid assay. B. GST fused NS5B was incubated with *in vitro* translated eIF3. Presence of eIF3 was detected by anti-HA antibody. Lane 1 : GST alone, lane 2 : GST-NS5B incubated with 10 ul of *in vitro* translated pcDNA-eIF3 mixture, lane3 : 20 uL of the mixture.

Hepatoma cell line에서 INF-α에 의한 translation 조절과 NS5B의 역할

INF-α가 실제로 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation를 down-regulation할 수 있는지 알아보고, NS5B가 INF-α에 의한 translation level의 감소를 회복시킬 수 있는지 알아보기 위하여 Huh7 cell에 dual reporter plasmid와 NS5B가 expression 되는 plasmid를 cotransfection 시켜주고 5시간 후에 INF-α를 처리하였다(Fig. 2). 결과에서 보듯이 INF-α 100 unit을 처리하였을 경우 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation이 모두 down-regulation 되었고 NS5B가 존재할 경우에는 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation이 모두 회복되는 것을 확인 할 수 있었다. Reporter인 firefly luciferase gene에 대한 competitive RT-PCR을 수행해 본 결과 INF-α를 처리했을 경우나 NS5B가 존재 함에도 불구하고 RNA 발현에는 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 3A). 따라서, luciferase activity의 감소는 translation level에서의 영향임을 알 수 있었다. 또한 NS5B를 cotransfection 해준 sample에서 western blotting을 통하여 NS5B를 detection 해본 결과 NS5B가 dose dependent 하게 expression 되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 이는 cell 내에서 expression 되는 NS5B에 의해서 luciferase의 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation이 회복 되었음을 의미한다.



IFN-a(100unit)	–	+	+	+	+
reproter(pR/HCV/F)	+	+	+	+	+
NS5B	–	–	0.2pmol	0.5pmol	0.9pmol

Fig. 2. Translation inhibition by IFN-α was reversed by NS5B in a hepatoma cell line. The dual reporter and NS5B expressing plasmids were transfected into Huh7 cells and IFN-α was treated after 5 hours. After 48 hours, relative luciferase activity was measured.

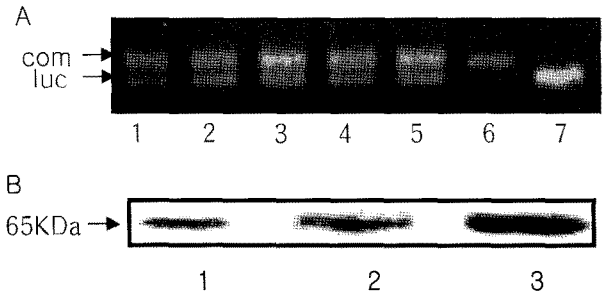
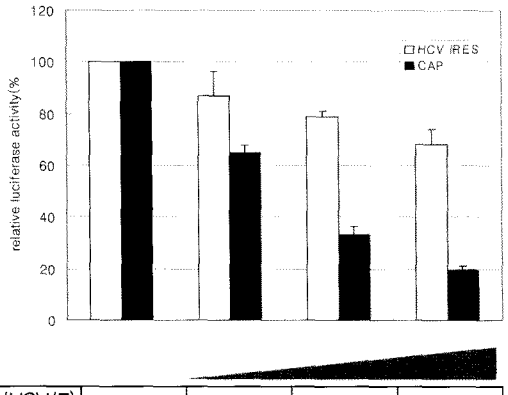


Fig. 3. RNA level of luciferase was identical in a IFN-α treated cells and NS5B detected by using western blot. Competitive RT-PCR. Lane 1, reporter (+); lane 2, R+IFN-α (100 unit); lane 3, R+IFN+NS5B 0.2 pmol; lane 4, R+IFN+NS5B 0.5 pmol; lane 5, R+IFN+NS5B 0.9 pmol; lane 6, (-); lane 7, luciferase. Western blot. Lane 1, NS5B 0.2 pmol; lane 2, NS5B 0.5 pmol; lane 3, NS5B 0.9 pmol.

In vitro 상에서 p56의 발현에 의한 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation의 조절

앞선 실험에서 INF-α에 의한 translation의 감소가 NS5B에 의해 다시 회복되는 것을 보았다. 이는 INF-α의 pathway 중 p56 pathway에 NS5B가 관여하기 때문이라 예상하였다. 따라서 p56과 NS5B에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. p56이 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 dual luciferase reporter plasmid와 p56이 expression 되는 plasmid를 rabbit reticulocyte lysate에 넣어주어 반응을 시켰다 (Fig. 4). Rabbit reticulocyte lysate에 plasmid를 넣어주면 rabbit reticulocyte lysate에는 transcription과 translation에 필요한 factor들이 모두 포함되어 있으므로 renilla와 firefly luciferase gene이 expression 된다. 반응 후 luciferase activity를 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 반응액에 넣어주는 p56의 양이 증가할수록 reporter의 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation level이 감소하였다. 특히 HCV IRES mediated translation은 p56에 의해 영향을 덜 받는 반면 cap mediated translation은 p56의 발현 정도에 따라 dose dependent manner로 expression level이 급격히 낮아졌다.



reporter(pR/HCV/F)	+	+	+	+
p56	–	0.02pmol	0.06pmol	0.2pmol

Fig. 4. p56 inhibited cap and HCV IRES mediated translation *in vitro*. The dual reporter and p56 expressing plasmids were incubated in Rabbit reticulocyte lysate and relative luciferase activity was measured.

Hepatoma cell line에서 p56의 발현에 의한 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation의 조절

*In vitro*에서의 TNT assay와 마찬가지로 hepatoma cell line인 Huh7 cell에 reporter plasmid와 p56이 expression 되는 plasmid를 cotransfection한 후 luciferase activity를 측정하여 translation에 있어서의 p56의 영향을 보았다(Fig. 5). Fig. 5A에서 보듯이 *in vitro*에서보다는 p56에 의한 영향이 적지만 cell에서도 p56의 발현에 의해서 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation level이 모두 감소하였다. 또한 앞서와 같은 방법으로 competitive RT-PCR을 수행해 본 결과 luciferase의 RNA level에는 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 5B). 이는 p56이 translation level에서 luciferase의 activity에 영향을 주었음을 의미한다. *In vitro*와 비교하여 cell에서 p56의 효과를 보기 힘든 이유는 IFN은 p56 pathway 뿐만 아니라 PKR이나 다른 pathway를 통해서도 영향을 주므로 p56이 IFN을 완전히 대신할 수는 없기 때문이라 생각된다.

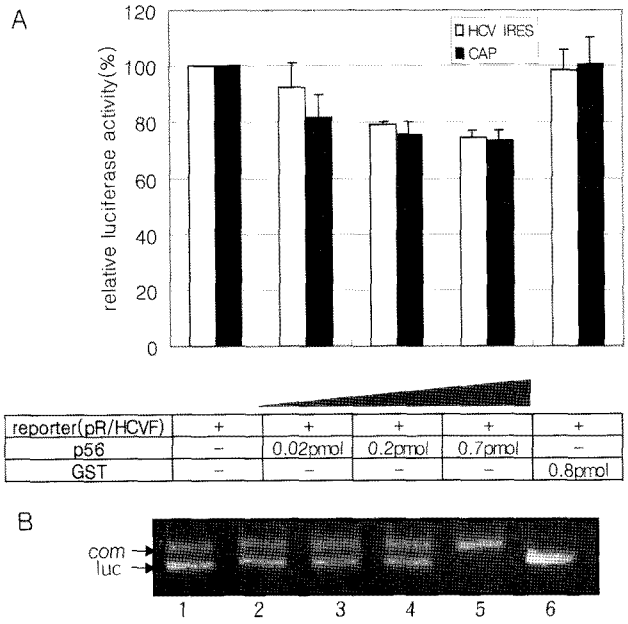
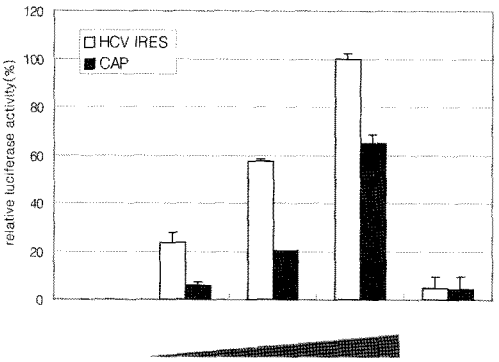


Fig. 5. p56 inhibited cap and HCV IRES mediated translation in a hepatoma cell line. Huh-7 cells were transfected with dual reporter, p56 and/or GST expressing plasmids. After 48 hours, luciferase activity was measured. Competitive RT-PCR. Lane 1, reporter (R); lane 2, R+p56 0.02 pmol; lane 3, R+p56 0.2 pmol; lane 4, R+p56 0.7 pmol; lane 5, (-); lane 6, luciferase.

*In vitro*에서 p56에 의한 translation down-regulation에 NS5B가 미치는 영향

앞선 실험에서 *in vitro* 상에서 p56 protein이 reporter의 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation을 down-regulation 하는 것을 보았다. 다음으로는 p56에 의한 translation down regulation이 NS5B에 의해 다시 회복될 수 있는지를 알아보고자 하였다. 앞의 실험에서와 같은 방법으로 *in vitro* 상에서 rabbit reticulocyte에 dual reporter plasmid와 p56, NS5B가 expression되는 plasmid를 넣어주고 control로 GST가 expression되는 plasmid를 넣어주어 반응을 시킨 후 luciferase activity를 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 p56에 의해서 감소된 translation level이 NS5B의 expression 양에 따라 dose dependent manner로 다시 회복되는 것을 볼 수 있었다. HCV IRES mediated translation은 100%에 가깝게 회복이 되었으며, cap mediated translation은 70%정도 회복되었다. 반면 GST를 expression 시켰을 경우에는 translation level에 변화가 없음을 확인하였다. 이는 NS5B가 over expression되어 p56과 p48과의 interaction을 방해하기 때문에 p48이 제 기능을 할 수 있기 때문이라 생각된다.

지금까지의 실험 결과들을 정리해보면 먼저 hepatoma cell line인 Huh7 cell에서 cap mediated translation과 HCV IRES mediated translation이 IFN-α에 의해 down-regulation 받는다는 것을 확인하였고, IFN-α에 의한 translation level의 감소가 NS5B에 의해 dose dependent하게 회복될 수 있음을 보았다. 또한 competitive RT-PCR을 통하여 IFN-α와 NS5B가 translation level에서 영향을 주는 것을 확인하였다. *In vitro* TNT assay와 cell culture system에서 IFN-α에 의해 induction 되는 p56에 의해 cap과 HCV IRES mediated translation이 inhibition 되며 다시 NS5B에 의해 회복됨을 확인하였다. Competitive RT-PCR을 통해 p56과 NS5B가 역시 translation level에서 luciferase activity에 영향을 줌을 확인하였다. Cell culture 상에서 p56의 효과가 크게 나타나지 않는 것은 IFN-α에 의해서는 p56 pathway 뿐만 아니라 PKR pathway와 같은 다른 pathway를 통해서 복합적으로 translation down-regulation의 효과가 나타나므로 p56 만으로는 IFN-α를 완전히 대신할 수는 없기 때문이라 예상된다.



reporter(pR/HCV/F)	+	+	+	+	+
p56(0.06pmol)	+	+	+	+	+
NS5B	–	0.06pmol	0.1pmol	0.2pmol	–
GST	–	–	–	–	0.2pmol

Fig. 6. Translation inhibition by p56 was reversed by NS5B *in vitro*. P56, NS5B and GST expressing plasmids were incubated with dual reporter plasmid in Rabbit reticulocyte lysate and relative luciferese activity was measured.

모든 실험 결과들을 종합해 볼 때 HCV의 NS5B는 p56과 p48과의 interaction을 inhibition 하는 것으로 보이며 HCV의 NS5B가 p56 pathway를 inhibition 함으로써 IFN에 resistance를 가질 수 있음을 시사한다. 지금까지는 HCV가 IFN에 resistance를 가질 수 있는 이유로 HCV의 E2 protein과 NS5A protein이 PKR pathway를 inhibition하기 때문이라고만 알려져 있으므로 NS5B가 p56 pathway를 inhibition 함으로써 IFN-α에 resistant 해질 수 있을 것이라는 예상은 새로운 측면에서의 접근이라 할 수 있다. P48과 p56의 상호작용에 의한 인터페론 시그널의 영향이 밝혀진 이후에 바이러스가 실제로 이 시그널에 대한 저항성을 나타내는 메커니즘으로 본 내용이 최초의 보고라는 데에 의미를 둘 수 있다[19].

감사의 글

이 연구는 2008학년도 한국외국어대학교 교내학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임

REFERENCES

1. Al, R. H., Y. Xie, Y. Wang, and C. Hagedon. 1998. Expression of recombinant hepatitis C virus non-structural protein 5B in *Escherichia coli*. *Virus Res.* **53**, 141-149.
2. Ali, N. and A. Siddiqui. 1997. 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. *J. Virol.* **69**, 6367-6375
3. Ali, N. and A. Siddiqui. 1995. Interaction of polypyrimidine binding protein with the 5' noncoding region of the HCV RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* **69**, 6367-6375.
4. Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* **68**, 5045-5055.
5. Bartenschlager, R. and P. Friebe. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.* **76**, 5326-2338.
6. Bartenschlager, R., V. Lohmann, F. Korner, J. Koch, U. Herian, and L. Theilmann. 1999. Replication of subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a Hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.

7. Bartenschlager, R. and V. Lohmann. 2000. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 1631-1648.
8. Behrens, S. E., L. Tomei, and R. De Francesco. 1996. Identification and properties of the RNA dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **15**, 12-22.
9. Cheng, J. U., M. Chang, and S. 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.
10. Collier, A. J., J. Gallego, R. Klinck, P. Cole, S. Harris, G. Harrison, F. Aboul-ela, G. Varani', and S. Walke. 2002. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3 binding site. *Nature Struct. Biol.* **9**, 375-380.
11. Cohen, J. 1999. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* **285**, 26-30.
12. Davis, G. L. 1999. Combination treatment with interferon and ribivirin for chronic hepatitis C. *Clin. Liver Dis.* **3**, 811-826.
13. Ferrari, E., M. Wright, J. Fang, B. Baroundy, J. Lau, and Z. Hong. 1999. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. *J. Virol.* **73**, 1649-1654.
14. Gale, M., Jr and R. Blakely. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protien : molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5208-5218.
15. Guo, J., D. Hui, W. Merick, and G. Sen. 2000 . A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *The EMBO J.* **19**, 6891-6899.
16. Hellen, C. U. T., T. Pestova, V. Kolupaeva, I. Lomakin, E. Pilipenko, I. Shatsky, and V. Agol. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7029-7036.
17. Hong, Z., J. Shim, G. Larson, and J. Wo. 2002. Selection of 3' template bases and initiating nucleotides by hepatitis C virus NS5B RNA dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **76**, 7030-7039.
18. Hui, D., C. Bhasker, W. Merrick, and G. Sen. 2003. Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2·GTP·Met-tRNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 39477-39482.
19. Lohmann, V. and F. Korner. (1999). Replication of subgenomic hepatitis c virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* **285,** 110-113.
20. Poynard, T, J. McHutchison, M. Manns, C. Trepo, K. Lindsay, Z. Goodman, and M. Ling. 2002. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **122**, 1303-1313.
21. Purcell, R. 1994. Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 2401-2406.
22. Taylor, D., S. Shi, and M. Lai. 2000. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes Infect.* 1743-1756.
23. Witherell, G. W., A. Knap, and C. Gluchowski. 1999. Hepatitis c virus non-structural 5A protein as a therapeutic target. *Curr. Opin. Anti-infect. Invesig. Drugs.* **1**, 565-573.
24. Zhu, H., H. Zhao, C. Collins, S. Eckenrode, and C. Liu. 2003. Gene expression associated with interferon alfa antiviral activity in an HCV replicon cell line. *Hepatology* **37**, 1180-2003.

(Received Aug. 20, 2008/Accepted Nov. 1, 2008)