

C형 간염바이러스(HCV)의 NS5B RNA Replicase에 의해 활성이 유도되는 Hammerhead 리보자임에 의한 HCV 복제 억제 연구

이창호 · 이성욱*

단국대학교 자연과학부 나노센서 바이오텍 연구소 분자생물학과

Inhibition of Hepatitis C Virus (HCV) Replication by 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, Republic of Korea

(Received September 5, 2011 / Accepted September 20, 2011)

As a specific and effective therapeutic genetic material against hepatitis C virus (HCV) multiplication, HCV internal ribosome entry site (IRES)-targeting hammerhead ribozyme which activity is allosterically regulated by HCV regulatory protein, NS5B RNA replicase, was constructed. The allosteric ribozyme was 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 nucleotide of HCV IRES. With real-time PCR analysis, the ribozyme was found to efficiently inhibit HCV replicon replication in cells. Of note, the allosteric ribozyme was shown to inhibit HCV replicon replication more efficiently than either HCV genome-targeting ribozyme or NS5B aptamer only. This allosteric ribozyme can be used as a lead genetic agent for the specific and effective suppression of HCV replication.

Keywords: allosteric hammerhead ribozyme, HCV IRES, hepatitis C virus, RNA aptamer

C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 *Flaviviridae* 속에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스로 인체에 감염하여 non-A, non-B 간염 및 간경화와 간암을 유발할 수 있다(16). 전 세계 인구 중 약 1억 7천만명 이상이 HCV에 감염되어 있지만 아직 이 바이러스에 대한 효과적인 치료제나 백신이 없는 상태이며 따라서, 이 바이러스를 억제할 수 있는 물질의 개발이 시급한 상황이다.

HCV 지놈 길이는 약 9.5 kilobase이며, 세포에 감염되면 5' untranslated region (UTR)에 HCV strain들 간에 그 서열이 매우 보존되어 있는 internal ribosome entry site (IRES)를 통해 cap-비의존적인 번역과정이 시작된다(1, 10), 감염 후 3,010에서 3,030개의 아미노산으로 이루어진 한 개의 복합 단

백질을 만든 후(5), 숙주와 바이러스의 proteases에 의해 가공되어, C, E1, E2 등의 구조 단백질과 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 등의 바이러스 증식에 필요한 조절 단백질들을 만들어 낸다(6). HCV에 의해 합성되는 단백질 중 하나인 NS5B는 RNA replicase 활성을 가지고 있어 바이러스의 지놈 복제에 중요한 역할을 하기에(4, 13, 19) 항 HCV 제제를 개발하는데 주요 표적이 되고 있다.

현재 사용되고 있는 항 HCV 치료제로는 α -interferon을 이용한 방법과 ribavirin을 동시에 투여하는 방법이 있으나 바이러스의 strain마다 그 효과가 다르게 보고되어 있으며 단지 40-50%의 HCV 감염환자에서만 지속적인 효과를 보여준다고 알려져 있다(9, 20). 최근 HCV NS3의 domain 중 하나인 protease에 대한 화학합성물질 기반 억제제(Teloprevir, Boscovir)가 신규 치료제로서 미국 FDA로부터 허가되어 HCV

* For correspondence. E-mail: SWL0208@dankook.ac.kr; Tel.: +82-31-8005-3195; Fax: +82-31-8005-4058

감염 치료율이 향상될 것으로 예상하고 있으나 escape 돌연변이 출몰 등의 한계점을 내포하고 있다(25).

siRNA (14), RNA aptamer (2, 11), antisense oligonucleotide (7), 리보자임(18, 23, 24) 등의 RNA 분자를 기반으로 한 저해제들이 새로운 항 HCV 제제로서 최근 활발히 개발되고 있다. RNA 분자는 매우 특이적으로 표적분자와 반응할 수 있으므로 side effect 또는 HCV 돌연변이들의 출몰 등을 억제할 수 있고 세포 내에서의 발현시 RNA 자체에 대한 면역반응은 유발되지 않는 장점들을 갖고 있다. 이러한 RNA 기반 억제제는 화학적 합성을 통하여 또는 세포 내 과발현을 통하여 항 바이러스 제제로 활용될 수 있다. 그러나 각각의 단일 RNA 분자만을 사용 시에는 특이성과 효능에 있어 한계가 있다. 따라서, 보다 특이적이며 효과적인 항 HCV 제제로 활용되기 위해선 HCV가 감염된 경우에서만 효과적으로 항 HCV 활성을 나타낼 수 있도록 상기의 RNA 산물들의 기능이 서로 결합된 새로운 산물의 개발이 필요하다.

최근 우리는 aptamer의 가역적인 표적 분자 인지 능력 및 표적 분자의 활성 억제 능력을 hammerhead 리보자임의 비가역적인 표적 RNA 절단 능력과 결합한 새로운 개념의 RNA 제제를 개발하였다(17). 이러한 리보자임은, allosteric하게 리보자임의 활성을 증진시킬 수 있는 communication module을 통하여, HCV 지놈 표적 hammerhead 리보자임과 HCV NS5B 단백질에 특이적으로 결합하는 NS5B aptamer를 결합한 구조이다. 본 연구에서는 이러한 allosteric 리보자임이 HCV 복제를 억제할 수 있는 능력이 있는지 검증하기 위하여 HCV subgenomic replicon의 세포 내 복제에 대한 억제능을 관찰하고, aptamer와 리보자임 각각만을 처리했을 경우와 비교하여 항 HCV 제제로서 효용성이 증대되는지 관찰하였다.

재료 및 방법

세포

Huh-7 인체 간암 세포주(cell line)를 ATCC로부터 구입하였으며 10% fetal bovine serum를 함유한 DMEM을 사용하여 배양하였다. HCV replicon 세포주를 구축하기 위하여 HCV genotype 1b NS3의 두 부위에 그리고 NS5A의 한 부위에 각각 돌연변이를 함유한 subgenomic replicon construct (15), pFK-I389neo/NS3-3'/5.1,를 사용하였다. Replicon 플라스미드를 *AseI* 및 *ScaI*로 절단한 후, 실험관 내 전사반응을 통해 HCV replicon RNA를 제작하였다. Gene pulser 시스템 (Bio-Rad, USA)을 활용한 전기충격을 통하여 HCV replicon RNA을 Huh-7 세포에 주입하였으며(950 μ F, 250 V), G418 (500 μ g/ml, Invitrogen, USA)을 이용하여 안정한 HCV replicon 세포주를 구축하였다.

NS5B 의존적 allosteric 리보자임 제작

NS5B 단백질 의존적으로 HCV IRES의 +382 부위를 표적, 절단할 수 있는 활성이 유도되는 hammerhead 리보자임을 제작하였다. 이를 위해 NS5B에 대한 aptamer와 hammerhead

리보자임 및 이전의 결과로 획득한 communication module (17) 염기서열을 overlapping PCR을 통하여 제작하였다. 증폭된 DNA를 *SalI* 및 *XbaI*로 절단한 후 pGEM T-easy 벡터 (Promega, USA)에 클로닝한 후 실험관 내에서의 전사반응을 통하여 리보자임 RNA를 제작하였다. Allosteric 리보자임의 세포 내 발현을 위하여 리보자임 cDNA를 *SalI* 및 *XbaI*으로 절단한 후 7SL RNA 프로모터를 이용한 발현 카세트(21)에 클로닝하였다.

Allosteric 리보자임의 실험관 내 자가절단(self-cleavage) 반응

Allosteric 리보자임의 특이성을 보기 위해, [γ - 32 P] UTP로 표지된 20 fmole의 야생형 리보자임 또는 allosteric 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. 반응이 끝난 RNA는 RNA loading dye를 섞은 후 95°C에서 변성시켜 7 M urea-10% polyacrylamide gel에서 180 V로 1시간동안 전기영동 하였으며, typhoon 8600을 사용하여 image를 얻은 후 Imagequant TL v2500 프로그램(GE healthcare, USA)을 이용하여 정량 분석하였다.

Luciferase reporter assay

Huh-7 세포 또는 HCV replicon 세포주에 allosteric 리보자임 발현벡터를 TransIT LT1 transfection reagent (Mirus Bio, USA)를 이용하여 reporter construct와 함께 도입한 후 luciferase 활성을 측정하였다. Reporter construct는 cap 의존적으로 Renilla luciferase를 발현하고 IRES를 통하여 Firefly luciferase를 발현하는 dicistronic luciferase construct (12)를 사용하였다. Luciferase는 luminometer TD-20/20 (Turner Designs Instrument, USA) 및 dual-luciferase reporter assay 시스템 (Promega)을 이용하여 측정하였다.

실시간(real time) PCR

HCV replicon 세포에 TransIT LT1 transfection reagent (Mirus Bio, USA)를 이용하여 allosteric 리보자임 발현 벡터를 도입하였다. 도입 후 30시간 후 total RNA를 추출한 후 HCV 지놈 양을 분석하기 위해선 HCV cDNA의 음성가닥 (negative strand) 특이적인 primer (5'-CGTAACACCAACGGGCGCGCCATG)를, 18S rRNA의 cDNA 양을 분석하기 위해선 random primer를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. 획득한 cDNA는 HCV replicon construct에 존재하는 neomycin 저항성 마커유전자에 대한 특이적인 primer (5'-CGTAACAACAACGGGCGCGCCATG, 5'-CTCGTCCTGCAGTTCATT CAGGGC)를 이용하여 PCR로 증폭하였다. Internal control로서 18S rRNA에 대한 cDNA를 증폭하였다 (primer; 5'-GTAA CCGTGAACCCATT, 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG).

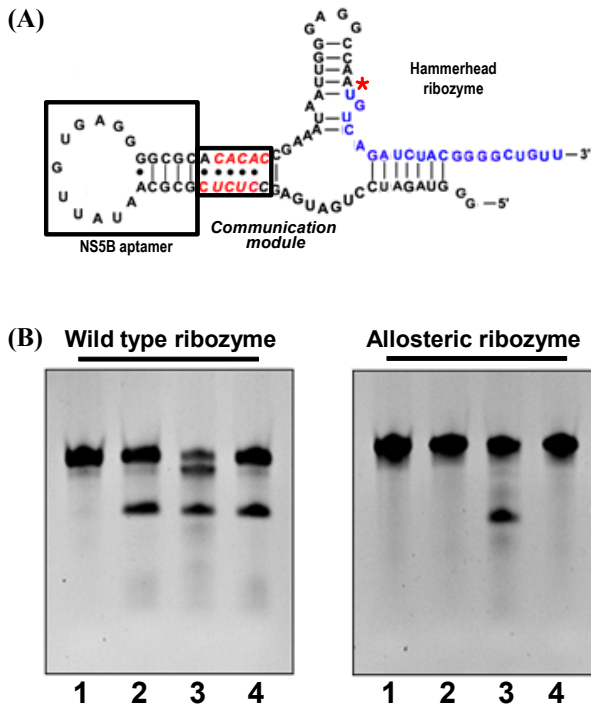


Fig. 1. Structure and characterization of allosteric ribozyme. (A) Composition and structure of allosteric ribozyme which activity is regulated by HCV NS5B protein. Asterisk indicates the cleavage site. (B) *In vitro* self-cleavage assay with the allosteric ribozyme. Wild type or allosteric ribozyme is incubated in the absence of any proteins (lane 2) or in the presence of NS5B (lane 3) or BSA (lane 4). Input RNA is loaded (lane 1).

Rotor-Gene (Corbett, USA) 및 SYBR Green PCR Core Reagents (PE Biosystems, USA)를 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초 동안 40 cycle 반응시켰다.

Western blot 분석

HCV replicon 세포에 allosteric 리보자임 발현 벡터를 도입한 후 30시간 후에 세포를 용해시켰다(buffer 조건; 50 mM Tris·HCl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% sodium azide, 0.1% SDS, 0.1% NP-40, and 0.5% sodium deoxycholate). 총 단백질을(50 µg)을 SDS-polyacrylamide gel 상에 loading한 후, 3시간동안 4°C, 300 mA 조건 하에서의 전기영동을 통하여 PVDF membrane (Bio-Rad) 상으로 전달하였다. Membrane을 5% (v/v) skim milk로 block 한 후 다음의 1차 및 2차 항체를 이용하여 Western blot 분석을 실행하였다: 1차 항체, mouse monoclonal anti-NS5B (Millipore, USA) 혹은 mouse anti-α-Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, USA); 2차 항체, goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology). 단백질 band는 enhanced chemiluminescence 프로토콜(Amersham-Pharmacia Biotech, UK)을 이용한 발광반응을 통하여 정량하였다.

결과

HCV NS5B 의존적으로 활성화되는 allosteric 리보자임 제작

Hammerhead 리보자임의 catalytic core 부위인 stem II 부위에 communication module을 통해 NS5B aptamer를 결합시킴으로써 NS5B 단백질이 aptamer와의 결합을 통해서만 리보자임의 catalytic 활성이 유도될 수 있는 리보자임을 제작하였다(Fig. 1A). 이 때 삽입한 communication module 염기서열은 리보자임 활성을 HCV NS5B 의존적으로 가장 잘 유도할 수 있는 서열이다. 이러한 서열은 무작위의 10 mer로 구성된 communication module 서열이 NS5B aptamer와 리보자임 사이에 삽입된 리보자임 라이브러리로부터 세포판 내에서의 선별과정을 통해 선별되었다(17). 제작한 리보자임이 과연 NS5B가 존재하는 경우에만 특이적으로 자가절단(self-cleavage) 활성이 유도될 수 있는지 검증하기 위하여, 방사성 동위원소로 표지된 리보자임을 BSA 혹은 NS5B 단백질과 반응시켰다. NS5B aptamer가 달려 있지 않은 야생형 리보자임의 경우 NS5B 단백질 존재 유무에 상관 없이 비특이적으로 자가절단 반응이 유도되었으나, allosteric 리보자임의 경우는 NS5B가 존재 시에만 특이적으로 자가절단 반응이 유도되었다(Fig. 1B).

Allosteric 리보자임에 의한 HCV 특이적인 표적 유전자 발현 억제

Allosteric 리보자임의 세포 내 특이적 반응을 관찰하기 위하여 HCV IRES의 +382 부위를 인지하는 리보자임을 제작한 후, HCV IRES에 의해 그 발현이 유도되는 reporter 유전자의 발현이 HCV 특이적으로 억제될 수 있는지 관찰하였다(Fig. 2). 우리는 이전의 결과로부터 HCV IRES 중 +382 부위가 가장 hammerhead 리보자임에 대한 접근성이 용이함을 관찰하였다(17). 세포 내 실험을 위해 allosteric 리보자임을 7SL promoter 조절 하에 세포 내에서 발현할 수 있는 발현 벡터를 제작하였다. 정상 Huh-7 세포 내에서는 야생형 리보자임의 발현을 통해서만 reporter 유전자 발현이 억제되었고, allosteric 리보자임 및 비활성화되어 있는 돌연변이 리보자임의 발현을 통해서만 리포터 유전자 발현에 아무 영향이 없었다(Fig. 2A). 반면에 HCV subgenomic replicon이 안정적으로 복제되는 Huh-7 세포에서는 allosteric 리보자임의 발현에 의해 reporter 유전자 발현이 억제되었으며, 그 억제능은 야생형 리보자임에 의한 발현 억제에 상응될 정도로 효율적이었다(Fig. 2B).

Allosteric 리보자임에 의한 HCV replicon 복제 억제

Allosteric 리보자임에 의해 과연 효과적으로 HCV 복제가 억제되는지 관찰하기 위해, HCV IRES를 표적화하는 allosteric 리보자임을 발현할 수 있는 발현 벡터를 HCV subgenomic replicon이 안정적으로 복제되고 있는 Huh-7 세포에 도입 후 HCV genome copy 수를 실시간 PCR을 통하여 분석하였다 (Fig. 3). 그 결과 allosteric 리보자임 발현 벡터의 도입 양에

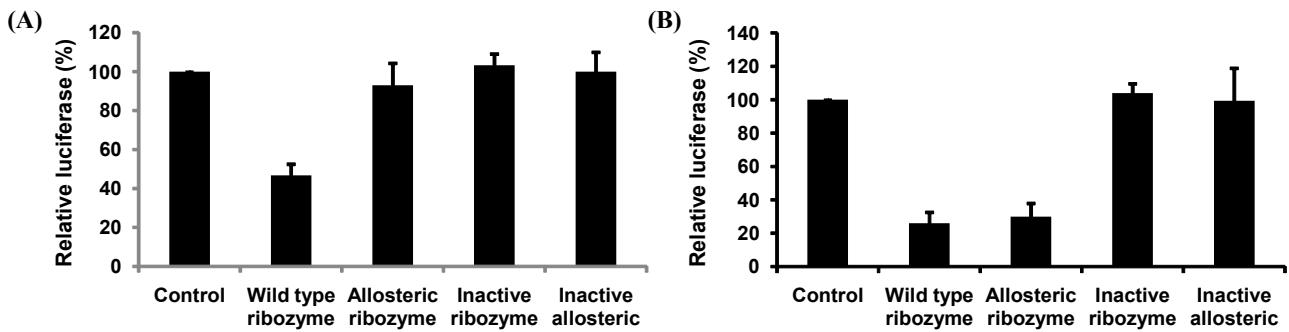


Fig. 2. HCV-dependent inhibition of IRES-mediated reporter activity by allosteric ribozyme. Expression vector encoding wild type or allosteric ribozyme, or inactive ribozyme or inactive allosteric ribozyme (1 μ g each) was transfected into naïve Huh-7 cells (A) or HCV replicon cells (B), and luciferase activity was represented as a relative to control cells transfected with control vector. Values shown represent the mean of three separate experiments with standard deviation.

의존적으로 최대 42%까지 HCV replicon 복제가 억제되었으며 1 μ g 도입시 그 억제능이 포화됨을 관찰하였다.

Allosteric 리보자임에 의한 HCV replicon 복제 억제능의 효능

Allosteric 리보자임에 의한 HCV 복제 억제능이 얼마나 효과적인지 검증하기 위해 allosteric 리보자임 발현 벡터를 도입한 HCV replicon 세포 내에서의 감소된 HCV 지놈 copy 수 및 HCV 단백질 양을 야생형 리보자임, 비활성 allosteric 리보자임 및 비활성 리보자임을 각각 발현하는 벡터를 도입한 HCV replicon 세포 내에서의 HCV 복제 감소도와 상호 비교 관찰하였다(Fig. 4). 야생형 리보자임의 경우는 표적 RNA를 절단하는 hammerhead 리보자임 활성만이 나타날 것이며, 비활성 allosteric 리보자임의 경우는 단지 RNA aptamer 활성만 보유하고 있을 것이다. 비활성 리보자임의 경우는 리보자임

및 RNA aptamer 활성이 모두 없는 대조군으로 이용하였다. 야생형 리보자임 및 비활성 allosteric 리보자임 발현 벡터를 도입한 세포에서의 HCV 지놈 copy 수를 control 벡터를 도입한 HCV replicon 세포에서와 비교시 각각 35% 및 26% 감소되었다. 반면에 allosteric 리보자임의 경우 가장 항 HCV 능이 뛰어나서, HCV 지놈 copy 수가 51%까지 줄어들었다(Fig.

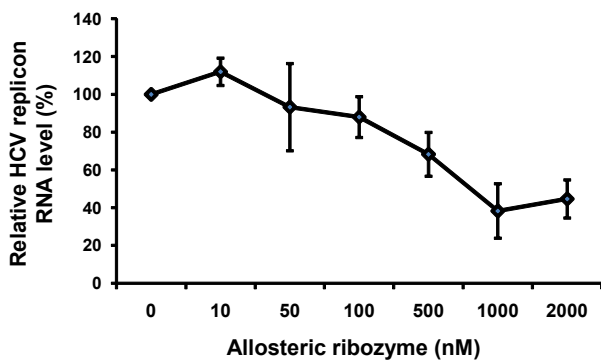


Fig. 3. Inhibition of HCV replicon replication by allosteric ribozyme in a dose dependent manner. Increasing concentration of expression vector encoding allosteric ribozyme was transfected into HCV replicon cells. HCV (-) subgenomic RNA levels were analyzed with real time PCR and expressed relative to the level in cells transfected with the control vector. Averages of three independent measurements are shown with standard deviation.

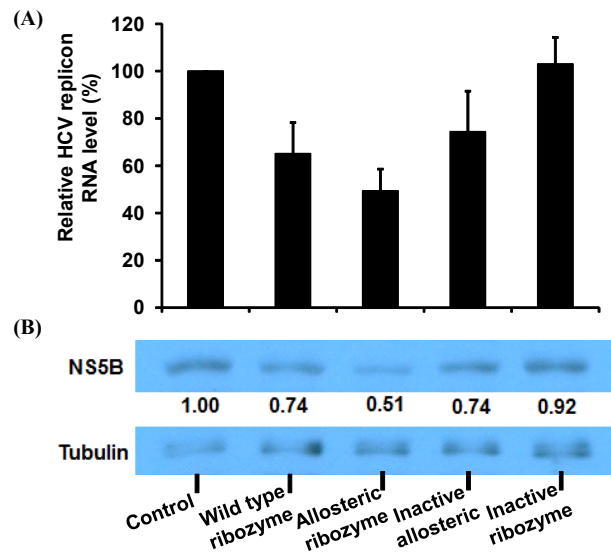


Fig. 4. Efficient inhibition of HCV replicon replication by allosteric ribozyme. Expression vector encoding wild type ribozyme, allosteric ribozyme, or inactive allosteric ribozyme or inactive ribozyme (1 μ g each) was transfected into HCV replicon cells. (A) HCV (-) subgenomic RNA levels were assessed, compared, and represented as a percentage of the level in cells transfected with control vector. Averages of three independent experiments are shown with standard deviation. (B) HCV NS5B protein level was assessed using western analysis and normalized to the level of internal control α -Tubulin. Relative expression of NS5B was represented relative to the sample transfected with 7SL control vector.

4A). HCV 조절 단백질인 NS5B 단백질의 양 역시 야생형 리보자임 및 비활성 allosteric 리보자임 발현 벡터에 의해 모두 감소되었지만, allosteric 리보자임 발현 벡터에 의해 그 양이 가장 많이 감소되었다(Fig. 4B).

고찰

본 연구에서는 HCV NS5B 의존적으로 HCV 지놈의 표적, 절단 활성이 유도되는 allosteric 리보자임(17)이 효과적으로 HCV replicon의 세포 내 복제를 억제할 수 있으며, 나아가 그 억제능이 HCV NS5B aptamer 및 리보자임 각각 단독에 의한 항 HCV 억제능보다 더 뛰어남을 관찰하였다. 이는 allosteric 리보자임을 이용하여, 표적 단백질과 결합하여 그 기능을 억제할 수 있지만 가역적인 결합력 때문에 기능 억제가 비효율적인 RNA aptamer 및 비가역적으로 바이러스 지놈을 표적하여 절단할 수 있지만 생체 내에서의 활성 효능이 비효율적인 hammerhead 리보자임의 한계점을 극복할 수 있음을 시사한다.

Allosteric 리보자임은 실험관 내에서 HCV NS5B 단백질이 있어야만 자가 절단 활성이 유도되었으며, 나아가 HCV replicon이 안정적으로 복제되는 세포에서만 표적 유전자 발현을 억제할 수 있었다, 이는 allosteric 리보자임의 경우, HCV NS5B 단백질이 세포 내에서 발현되어야지만 NS5B aptamer와의 결합을 통해 리보자임의 활성화가 유도되어, 기질 RNA와 *trans*하게 반응함을 시사한다. 즉 allosteric 리보자임의 경우, HCV 감염 세포 특이적으로만 리보자임 활성이 유도됨을 시사한다. 이러한 특이성은 혹 있을지 모르는 정상세포에 도입된 리보자임의 비특이적인 off-target 효과를 최소화할 수 있는 장치가 될 수 있을 것이다.

개발된 allosteric 리보자임은, 가역적으로 표적 단백질인 HCV 조절 단백질에 결합함으로써 그 기능을 억제할 수 있는 aptamer (11, 26)와 비가역적으로 표적 RNA인 HCV 지놈 RNA를 표적하여 절단할 수 있는 hammerhead 리보자임이 하나의 RNA 분자로 결합된 새로운 개념의 항 HCV 억제제로 활용될 수 있을 것이다. 실제로 본 연구에서 관찰된 항 HCV 결과, allosteric 리보자임은 HCV 지놈을 표적하는 리보자임 단독에 의한 항 HCV 효과 및 aptamer 서열은 갖고 있으나 리보자임의 catalytic core 부위가 돌연변이 되어 있는 비활성화 allosteric 리보자임, 즉 HCV NS5B와 결합하는 RNA aptamer 단독에 의한 항 HCV 효과보다 더 뛰어났다. 이는 allosteric 리보자임의 경우, 두 가지 다른 RNA 저해제들에 의한 항 HCV 효과가 상승적으로 작동하여 나타난 결과로 유추할 수 있다. 또한 RNA aptamer와 HCV 단백질 간의 결합을 통해, allosteric 리보자임의 세포 내 위치가 HCV가 복제되고 있는 rough 소포체와 연결되어 small vesicle로 구성되어 있는 membrane web (22) 상으로 집중될 수 있을 것이며, 이를 통하여 allosteric 리보자임의 HCV 지놈에 대한 접근성이 보다 더 용이하게 됨으로써 항 HCV 효능이 증대될 수도 있을 것이다.

개발된 NS5B 의존적 allosteric 리보자임은 항 HCV 제제

로서뿐만 아니라 HCV 감염을 진단 할 수 있는 리보스위치 개념의 biosensor (3, 8, 27)로서도 활용이 가능하다. 또한 자가 절단 리보자임을 NS5B 단백질 의존적으로 HCV 증식에 주요한 숙주인자에 대한 antisense sequence를 방출하게 제작함으로써, HCV 복제 특이적으로 숙주 인자의 발현을 억제하고 동시에 aptamer 활성을 통한 HCV 조절 인자의 기능 저해를 통해, HCV 복제를 효과적이며 특이적으로 억제할 수 있는 저해제로서도 활용 가능할 것이다. 나아가 HCV 복제 특이적인 자가 절단 활성 유도를 통한 HCV 특이적인 RNA 방출 효과를 통해, allosteric 리보자임을 아직 많은 부분이 밝혀져 있지 않은 HCV 복제 과정을 연구할 수 있는 도구로서도 활용할 수 있을 것이다.

적요

C형 간염바이러스(hepatitis C virus; HCV) 증식을 효과적이며 특이적으로 제어할 수 있는 유전산물로서, HCV 증식조절인자인 NS5B RNA replicase 존재에 의해 allosteric하게 활성이 유도될 수 있는 HCV internal ribosome entry site (IRES) 표적 hammerhead 리보자임을 개발하였다. 이러한 리보자임은 HCV IRES 염기서열 중 +382 nucleotide 자리를 인지하는 hammerhead 리보자임, NS5B RNA replicase와 특이적으로 결합하는 RNA aptamer 부위, 그리고 aptamer와 NS5B와의 결합에 의해 리보자임 활성을 유도할 수 있도록 구조적 변이를 전달할 수 있는 communication module 부위 등으로 구성되어 있다. 이러한 allosteric 리보자임에 의해 세포 배양에서 HCV의 replicon 복제가 효과적으로 억제됨을 실시간 PCR 분석을 통하여 관찰하였다. 특히, HCV 지놈을 표적하는 리보자임 단독, 또는 HCV NS5B에 대한 RNA aptamer 단독에 의한 HCV 복제 억제능보다 allosteric 리보자임에 의한 HCV 복제 억제능이 더 뛰어났다. 따라서 개발된 allosteric 리보자임은 HCV 증식의 효과적인 증식 억제 선도물질로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 말

HCV replicon construct를 제공해 주신 Ralf Bartenschlager 박사(Heidelberg University, Germany) 및 7SL RNA 기반 유전자 발현 벡터를 제공해 주신 David R. Engelke 박사(University of Michigan, USA)께 감사드립니다. 이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구이다(KRF-2008-313-C00668).

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. 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.
3. Breaker, R.R. 2002. Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 31-39.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Hwang, B., J.H. Lim, B. Hahm, S.K. Jang, and S.W. Lee. 2009. hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 584-588.
 13. 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.
 14. Khaliq, S., S.A. Khaliq, M. Zahur, B. Ijaz, S. Jahan, M. Ansar, S. Riazuddin, and S. Hassan. 2010. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnol. Adv.* 28, 27-34.
 15. Krieger, N., V. Lohmann, and R. Bartenschlage. 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* 75, 4614-4624.
 16. Lauer, G.M. and B.D. Walker. 2001. Hepatitis C virus infection. *New Engl. J. Med.* 345, 41-52.
 17. Lee, C.H. and S.W. Lee. 2007. Development of hepatitis C virus (HCV) genome-targeting hammerhead ribozyme which activity can be allosterically regulated by HCV NS5B RNA replicase. *Kor. J. Microbiol.* 43, 159-165.
 18. 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, and *et al.* 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.
 19. Moradpour, D., V. Brass, R. Gosert, B. Wolk, and H. Blum. 2002. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. *Trends Mol. Med.* 8, 476-482.
 20. 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.
 21. Paul, C.P., P.D. Good, A. Kleihauer, J.J. Rossi, and D.R. Engelke. 2003. Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol. Ther.* 7, 237-247.
 22. Penin, F., J. Dubuisson, F.A. Rey, D. Moradpour, and J.M. Pawlotsky. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Schlutter, J. 2011. Therapeutics: new drugs hit the target. *Nature* 474, S5-S7.
 26. Shin, K.S., J.H. Lim, J.H. Kim, H. Myung, and S.W. Lee. 2006. Inhibition of the replication of hepatitis C virus replicon with nuclease-resistant RNA aptamers. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1634-1639.
 27. 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.