

C형 간염바이러스(HCV) 유전체를 특이적으로 변형할 수 있는 Trans-Splicing Aptazyme 발굴

김주현 · 이창호 · 장선영 · 이성욱*

단국대학교 자연과학부 분자생물학과 나노센서 바이오텍 연구소

C형 간염바이러스(hepatitis C virus; HCV) 복제를 효과적이며 특이적으로 제어할 수 있는 유전산물을 개발하기 위하여 특정 리간드 존재에 의해 allosteric하게 그 활성이 조절될 수 있는 HCV 유전체 표적 *trans-splicing* 리보자임(*trans-splicing aptazyme*)을 발굴하였다. 이러한 *trans-splicing aptazyme*은 특정 리간드와 특이적으로 결합하는 RNA aptamer 부위, aptamer와 리간드와의 결합에 의해 리보자임 활성을 유도할 수 있도록 구조적 변이를 전달할 수 있는 communication module 부위 및 HCV IRES의 +199 nt를 인지하는 *trans-splicing* 리보자임 등으로 구성되도록 설계하였다. 특히 *trans-splicing* 리보자임의 catalytic core의 P6과 P8 부위에 aptamer와 communication module을 삽입하였을 때 가장 allosteric하게 리보자임 활성이 유도되었다. 이러한 리보자임은 리간드가 없거나 대조 리간드가 존재할 때에는 *trans-splicing* 반응을 유도하지 못하였으나 특정 리간드가 존재할 때에만 효과적이며 특이적으로 *trans-splicing* 반응을 유도하여 표적 RNA를 변형시킬 수 있음을 관찰하였다. 이러한 aptazyme은 HCV 증식에 대해 특이적이며 효과적인 억제제를 위한 선도물질로 이용 가능할 뿐 아니라 HCV 치료선도 물질의 스크리닝용 도구로서도 활용될 수 있을 것이다.

Key words □ aptazyme, communication module, hepatitis C virus, RNA aptamer, *trans-splicing* ribozyme

C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus; HCV)는 *Flaviviridae* 속 에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스로 주로 수혈에 의해 전염되는 것으로 알려진 non-A, non-B 간염을 일으키는 주요 병원성 바이러스이다(15). HCV는 급성 감염을 일으키고, 그 중 약 80%가 만성으로 진행되며, 만성 간염 환자 중 20%는 5~20년 내에 간경변증으로 전이되고 그 후 5~6년이 경과되면 절반 정도에서 간암으로 발전되어 치사율이 매우 높은 것으로 알려져 있다(23). 간 질환이 특히 많은 우리나라를 비롯하여 전 세계 인구의 1~2%가 이 바이러스에 감염되어 있지만 아직 이 바이러스에 대한 효과적인 치료제나 백신 등의 예방법이 개발되어 있지 않은 형편이다. 따라서 HCV 복제를 효과적으로 제어할 수 있는 항바이러스제 또는 치료법의 개발이 시급한 상황이다.

HCV 유전체는 약 9.5 kilobase의 길이로 이루어져 있으며 바이러스 감염 후 자기 자신의 유전체를 기질로 하여 3,010에서 3,030개의 아미노산으로 이루어진 하나의 복합 단백질이 만들어진다(6). 특히 HCV가 복제하는 데에 5' untranslated region (UTR)과 3'UTR이 매우 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있다. 5'UTR의 경우 HCV strains에서 매우 보존되어 있는 internal ribosome entry site (IRES)를 갖고 있어 cap-independent하게 번역 과정이 일어난다(1, 14). 감염 후 먼저 생성된 복합 단백질은 숙주와 바이러스의 proteases에 의해 가공되어, C, E1, E2 등의

구조 단백질과 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 등과 같은 바이러스 증식에 필요한 조절 단백질들이 만들어진다(7). HCV는 양성 단일 가닥이므로 자신의 유전체를 복제하기 위해서는 크게 두 단계의 과정을 거치는데 먼저 상보적인 음성 단일 가닥을 합성하고 이것을 주형으로 이용하여 유전체를 합성하게 된다. HCV 단백질들의 합성 및 분포는 소포체의 lumen (E1, E2 등), 소포체막 사이(p7, NS2, NS4A, NS4B 등) 또는 소포막에 associate 된 상태로 세포질에 위치(C, NS3, NS5A, NS5B 등) 하며 특히 조절 단백질들이 복제 복합체 형태를 이루어 rough 소포체와 연결된 membraneous web 형태(small vesicle로 구성)로 존재한다고 알려져 있다(19). 이 때 3'UTR은 짧지만 보존되어 있지 않은 다양한 염기서열과 여러 길이의 polypyrimidine 트랙 그리고 3'X라 불리는 96개의 염기서열로 구성되어 있어 여기에 복제 복합체가 결합하여 RNA 유전체 복제를 개시하는 것으로 보고되고 있다(2).

현재 HCV 증식을 억제하여 HCV 감염에 의한 질병에 어느 정도 효과를 보이고 있는 방법으로 α -interferon을 단독으로 이용하거나 ribavirin을 동시에 투여하는 방법 등이 있으나 일반적으로 그 효과가 한정적이며 일시적일 뿐만 아니라 다양한 부작용을 유발할 수 있다. 또한 바이러스의 strain마다 그 효과가 다르게 보고되어 있으며 단지 40%의 HCV 감염환자에게만 지속적인 효과를 보여 준다고 알려져 있다(9, 17).

항 HCV 제제로서 최근 활발히 개발되고 있는 것은 RNA 분자를 기반으로 한 저해제이다. 특히 21-23 nucleotide 길이의

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

RNA duplex로 구성되어 있어 RNA 간섭현상을 유발하여 표적 RNA의 degradation을 유발할 수 있는 siRNA, 염기 배열에 따라 특정한 3차 구조를 형성함으로써 표적 단백질과 높은 친화력과 특이성을 갖고 결합할 수 있는 RNA aptamer (4, 10), 표적 RNA를 *trans*하게 특이적으로 인지하여 절단할 수 있는 리보자임 등을 기반으로 한 RNA 저해제 개발에 대한 연구가 최근 급증하고 있다. 그 예로서 HCV의 보존된 염기서열을 표적하는 siRNA (5, 12) 또는 리보자임(16) 및 HCV의 NS3 RNA helicase domain과 결합하는 RNA aptamer (10)를 세포 내에 직접적으로 주입하거나 또는 RNA를 발현할 수 있는 벡터로 도입할 경우 효과적으로 HCV의 replicon 복제가 억제될 수 있다는 결과들이 보고되었다.

이러한 RNA 분자의 장점은 매우 특이적으로 표적분자와 반응할 수 있으므로 side effect 또는 HCV 돌연변이들의 출몰 등을 억제할 수 있고 또한 세포 내에서 RNA를 발현시 RNA 자체에 대한 면역반응이 일어나지 않는 것이다. 특히 RNA는 화학적 합성 및 변형이 용이하므로 화합 약품의 형태로서 이용될 수 있고 또한 세포 내 과발현이 용이하므로 DNA 발현 벡터 형태의 유전자 치료제로서도 이용이 가능하다. 그러나 각각의 단일 방법만을 이용하여 HCV 복제를 억제하기 위해선 아직 그 특이성 및 안전성과 효능에 한계가 있다. 따라서 보다 특이적이며 효과적으로 HCV 증식을 억제하기 위해선 HCV가 감염된 세포에서만 효과적으로 HCV 복제만을 제어할 수 있는 새로운 유전산물의 개발이 필요하다.

최근 본 연구실에선 HCV 유전체의 IRES RNA 특정 부위를 표적한 후 그 RNA를 *trans*-splicing 반응을 통하여 치료 기능을 가진 유전자 산물로 치환, 변형할 수 있는 *Tetrahymena* group I intron 기반 리보자임을 개발하였다(21). 이러한 리보자임은 HCV RNA 레벨을 감소시킴과 동시에 HCV RNA가 존재하는 곳에서만 치료 유전자 활성을 유도할 수 있으므로 HCV 복제를 보다 더 효과적으로 제어할 수 있을 것이다. 그러나 보다 더 안전하고 효과적인 유전자 치료제로서 *trans*-splicing 리보자임이 활용되기 위해선 보다 더 특이적으로 그리고 보다 더 높은 활성을 가지고 HCV 감염된 세포에서만 치료용 유전자 활성을 유도할 수 있는 새롭게 개선된 리보자임 시스템이 필요하다.

본 연구에서는 aptamer의 가역적인 표적 분자 인지를 통한 표적 분자의 활성 억제 능력을 *trans*-splicing 리보자임의 비가역적인 표적 RNA 치환 능력과 결합한 새로운 개념의 항 HCV 억제제를 개발하고자 하였다. 특히 *trans*-splicing 리보자임의 활성이 특정 리간드가 aptamer와 결합하여야지만 allosteric하게 유도될 수 있는 즉 리간드가 있는 경우에서만 치료용 유전자 활성을 유도할 수 있는 *trans*-splicing aptazyme을 개발하고자 하였다(Fig. 1). 이러한 새로운 개념의 aptazyme 분자를 개발하기 위해 리보자임의 어느 도메인에 aptamer를 삽입 할 때에 aptamer와 리간드 간의 결합에 의해 리보자임 활성을 유도할 수 있는지 탐색하였으며 그러한 변형된 도메인을 가진 aptazyme이 과연 리간드의 존재 시에만 *trans*-splicing 활성을 유도하는지 검증하였다. 본 연구에선 모델 시스템으로 theophylline에 대한 특이적인 aptamer와

aptamer-리간드의 결합에 의해 allosteric하게 리보자임의 활성을 증진시킬 수 있는 communication module 염기서열을 *Tetrahymena* group I intron의 여러 catalytic 도메인에 삽입한 후 그 활성을 탐색하였다.

재료 및 방법

기질인 HCV IRES RNA 제조

리보자임의 표적 RNA를 제작하기 위하여 HCV 1b 타입의 IRES RNA의 +18 nucleotide (nt) 부위부터 +402 nt 부위까지 포함되어 있는 DNA [pH(18-402)CAT] 벡터를 HCV 유전체의 +402 부위를 인지하는 *Bam*HI으로 절단하였다. 선형화된 DNA 벡터를 T7 RNA 중합효소(TaKaRa, Otsu, Japan)와 37°C에서 3 시간 동안 반응하여 *in vitro* 상에서 전사반응을 수행하여 표적 RNA를 제조한 후 urea가 포함된 acrylamide gel로부터 정제하였다. 이러한 표적 RNA는 HCV 유전체의 5'UTR과 core 부위 일부분을 포함하고 있다.

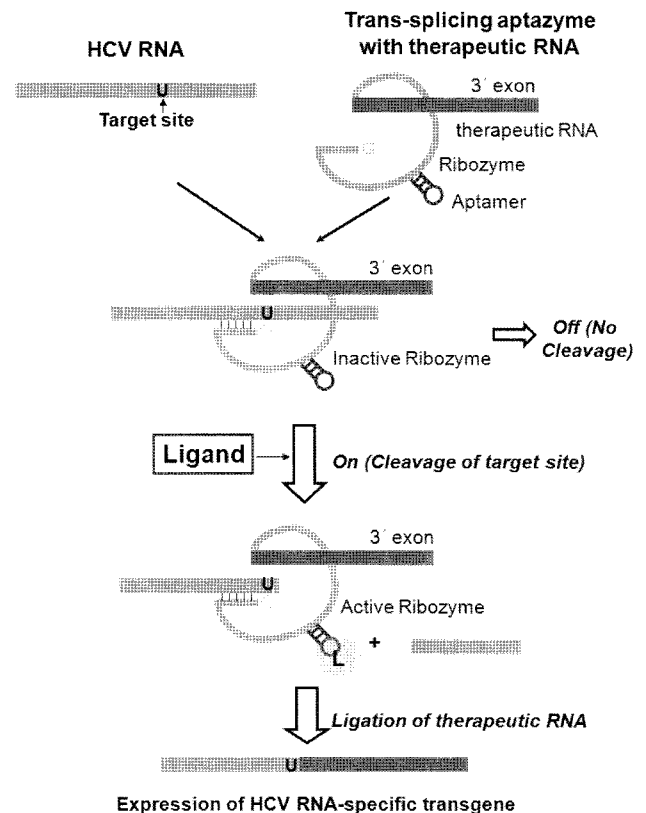


Fig. 1. Schematic diagram of regulated RNA replacement with ligand-controllable *trans*-splicing aptazyme. The aptazyme can recognize HCV genome RNA by base pairing through its IGS. However, the aptazyme can be structurally and functionally active only in the presence of specific ligand (L), and then remove the sequence downstream of the target site and replace it with a 3' exon that encodes therapeutic RNA sequence.

Trans-splicing aptazyme 제조

Aptazyme 개발을 위한 기본 *trans*-splicing 리보자임 골격은 HCV IRES의 +199 부위를 특이적으로 인지하고 P1, P10 그리고 표적 RNA에 대한 300개의 antisense sequence가 첨가된 extended internal guide sequence (IGS)를 가진 group I intron 리보자임을 이용하였다(21). *Trans*-splicing 리보자임 library를 이용한 RNA mapping 방법을 통하여 표적 HCV RNA에서 IRES의 +199 부위가 ribozyme에 대한 accessibility가 가장 뛰어난 부위였으며(21), 이러한 특정 부위를 인지하는 리보자임은 세포에서 HCV IRES RNA 특이적으로 transgene을 발현시킴으로써

HCV 발현 세포 특이적으로 도입 유전자 활성을 유도할 수 있었다(22).

본 과제에서 제조한 aptazyme은 기본적으로 3가지 structural module로 구성되어 있다(Fig. 2A). 첫 번째 module은 theophylline에 대한 RNA aptamer 부위이다(11). 두 번째 module은 aptamer의 ligand 결합에 의한 구조적 변이를 리보자임의 구조적 변이로 전환시키는데 관여하는 communication module이다. 본 과제에서는 aptamer와 theophylline 결합에 의해 리보자임 활성을 induce시키는데 관여하는 communication module (13)을 이용하였다. 세 번째 module은 HCV IRES 내에서 리보자임에 대한 가장 적

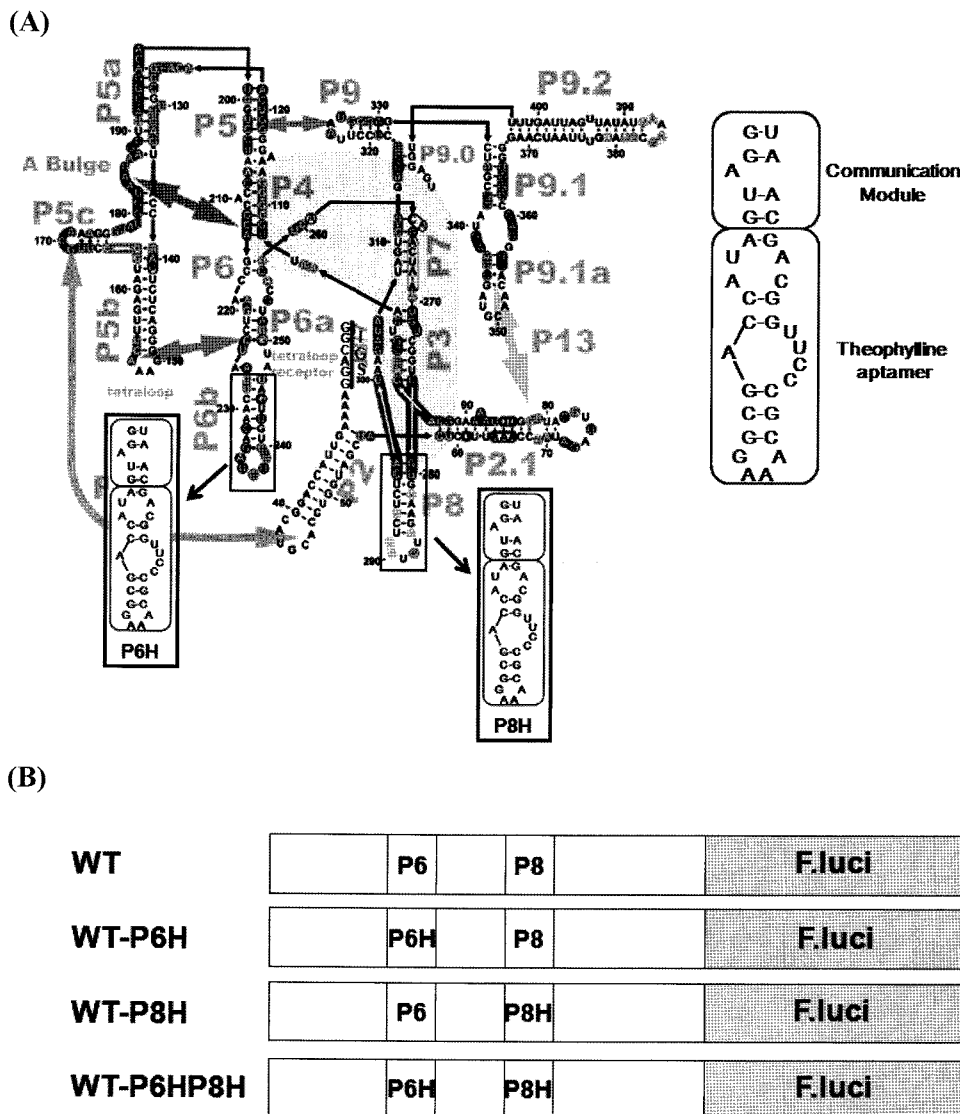


Fig. 2. Sequence and structure of *trans*-splicing aptazyme. (A) Scheme of *Tetrahymena* group I intron was depicted at left panel. Substrate binding site, IGS, was indicated at the 5'end of the intron. Sequence and structure of theophylline-specific aptamer and communication module was indicated in boxes at right panel. Aptamer plus communication module was inserted at P6 (P6H) or P8 (P8H). (B) Theophylline-responsive *trans*-splicing aptazyme. Sequence of aptamer plus communication module was incorporated into P6, P8, or both P6 and P8 of *Tetrahymena* group I intron to construct *trans*-splicing aptazyme (WT-P6H, WT-P8H, WT-P6HP8H, respectively). WT represents *trans*-splicing ribozyme derived from original *Tetrahymena* group I intron. Each ribozyme contains firefly luciferase gene (F.luci) as 3' exon.

합한 부위인 +199 부위를 인지하여 새로운 RNA로 치환할 수 있는 *trans*-splicing 리보자임 부위(21)이다. RNA aptamer와 communication module 구조를 *trans*-splicing 리보자임의 catalytic 기능을 위한 RNA folding에 주요한 역할(13)을 하는 P6 또는 P8 domain에, 또는 P6과 P8 domain 두 곳 모두에 동시에 부착시켰다. 결론적으로 wild-type 리보자임 (WT), WT의 P6, P8 또는 P6과 P8에 aptamer와 communication module sequence가 부착된 리보자임(각각 WT-P6H, WT-P8H, WT-P6HP8H) 등 4가지 리보자임을 제작하였다(Fig. 2B). 제작한 aptazyme들의 *trans*-splicing 기능을 검증하기 위하여 리보자임의 3' exon에 firefly luciferase (F.luci)를 삽입한 aptazyme construct들을 제조하였다. 리보자임 제작을 위해 우선 WT 리보자임 벡터를 기질로 한 후 overlapping PCR 방법을 이용하여 각 aptazyme 벡터를 제작한 후 T7 RNA 중합효소(TaKaRa, Otsu, Japan)와 37°C에서 3시간 동안 반응하여 *in vitro* 상에서 전사반응을 수행하여 각 리보자임 RNA를 제조한 후 urea가 포함된 acrylamide gel로부터 정제하였다.

Aptazyme의 *trans*-splicing 반응

제작한 리보자임 RNA와 기질 RNA를 우선 95°C에서 1분 30초 동안 변성시킨 후 37°C에서 15분 동안 반응시켜 구조를 재형성시켰다. 리보자임(50 nM)과 기질 RNA (10 nM)를 splicing 조건(50 mM HEPES; pH 7.0, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100 μM guanosine) 하에서 37°C 3시간 반응 후 형성된 산물을 RT-PCR 반응을 통하여 분석하였다. Splicing 반응시에 물 또는 0.5 mM caffeine (theophylline 구조 유사체로서 allosteric 효과의 특이성에 대한 대조군), 또는 0.5 mM theophylline과 함께 반응시킴으로써 *trans*-splicing 반응이 theophylline 특이적으로 allosteric하게 유도되는지 관찰하였다. 이 때 RT를 위한 primer는 luciferase 인지부위(5'-CCCAAGCTTGCGCAACTGCAACTCCGA TAA)이며 PCR을 위한 5' primer는 기질 RNA의 5' end(5'-GGAATTCGCGAGCGTGCCTGCTGCT)를, 3' primer는 luciferase를 인지하는 부위(5'-CCCAAGCTTCACTGCATACGA CGATT)를 이용하였다. PCR은 denaturation 96°C 5분, annealing 60°C 30초, extension 72°C 30초로 22 cycle 동안 수행하였다. 반응이 끝난 RT-PCR 산물은 3% agarose gel 상에서 전기영동하여 분석하였다.

Trans-splicing 반응의 정확성

리보자임과 기질 RNA 간의 반응 후 획득한 *trans*-splicing RNA의 RT-PCR 산물을 agarose gel 상에 정제 한 후 pUC19 벡터를 이용하여 결찰 반응을 시켰으며, *E. coli*에 열 충격 방법으로 형질 전환 시킨 후 ampicillin (Sigma, St. Louis, USA) 항생제가 들어있는 agar plate에서 배양했다. 형질 전환된 균체 중 수십 개를 선택하여 DNA 정제를 수행하였으며, *EcoRI*를 사용하여 삽입되어 들어간 clone들을 탐색하였다. 탐색된 clone DNA에 5× sequencing buffer, terminator ready reaction, 3.2 pmole M13 forward primer 등을 넣은 후, 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4초의

조건으로 25 cycle의 PCR을 수행하였다. 최종적으로 획득한 PCR 산물에 template suppression reagent를 넣어주고, 변성 과정을 거친 후 염기 서열 분석 기계(ABI PRISM, Foster City, USA)를 이용하여 그 염기 서열을 결정하였다.

결 과

리간드 의존성 *trans*-splicing aptazyme 제작

Group I intron 리보자임의 활성을 위해선 올바른 3차 구조 형성이 중요한데 특히 P5b helix 말단에 존재하는 tetraloop과 P6a helix 부위에 존재하는 tetraloop receptor 간의 interaction 등이 중요하다 알려져 있다(20, Fig. 2A). 반면 P6b stem-loop 구조는 다른 hairpin 구조로 치환하여도 효소 활성에는 변화가 없다고 알려져 있다. 따라서 P6b의 tetraloop receptor 부위 바로 아래에 존재하는 stem-loop 구조에 theophylline aptamer와 communication module sequence를 삽입한 리보자임(WT-P6H)을 제작하여 과연 theophylline이 존재해야지만 allosteric하게 group I intron의 구조가 변형되어 *trans*-splicing 기능이 유도되는지 관찰하였다(Fig. 2B). 또한 역시 다른 stem-loop 구조로 치환하여도 효소 활성에 영향을 끼치지 않는 P8 부위에 theophylline aptamer와 communication module sequence를 삽입한 리보자임(WT-P8H)을 제작 후 allosteric 기능을 관찰하였으며 나아가 P6b와 P8 부위 모두를 aptamer와 communication module sequence로 치환한 리보자임(WT-P6HP8H)도 제작하여 allosteric 기능을 관찰하였다. 대조군으로는 wild type *Tetrahymena* group I intron의 P6과 P8 도메인을 갖고 있는 *trans*-splicing 리보자임(WT)을 이용하였다(Fig. 2B).

Aptazyme에 의한 리간드 의존성 *trans*-splicing 반응 유도

제작한 각각의 리보자임과 기질 RNA를 아무 리간드 없이, 또는 aptamer가 결합하는 theophylline과 함께, 또는 대조 리간드로서 caffeine과 함께 반응 후 *trans*-splicing 산물 형성 여부를 관찰하였다. Caffeine의 구조는 theophylline의 N-7 부위에 메틸기가 첨가된 물질로서 theophylline의 구조와 매우 유사하다. 그러나 본 연구에서 활용한 theophylline 특이적 aptamer의 경우 caffeine과의 결합력이 1,000배 이상 떨어진다고 알려져 있다(8). 즉 이러한 사실은 theophylline aptamer가 매우 특이적으로 대상 리간드와 결합함을 시사한다.

WT 리보자임은 예상과 같이 caffeine, theophylline, 물에 상관 없이 항상 *trans*-splicing 반응을 유발하였으며 WT-P6H와 WT-P8H의 경우에도 어떠한 화합물을 처리하던 상관없이 반응이 유발되었다(Fig. 3A). 또한 WT, WT-P6H, WT-P8H 리보자임에 의한 *trans*-splicing 반응은 각 리간드 존재에 상관없이 거의 일정히 일어났다(Fig. 3C). 반면에 WT-P6HP8H 리보자임의 경우 theophylline을 처리한 경우에만 특이적으로 319 bp의 길이의 *trans*-splicing 산물이 생성되었다(Fig. 3A). 대조구로서 리보자임 없이 표적 RNA만 반응시에는 어떠한 산물도 형성되지 않았으며 비특이적인 RNA와 각각의 리보자임을 theophylline과 함께 반응

시에도 역시 어떠한 *trans*-splicing 산물도 형성되지 않았다(Fig. 3B). 즉 생성된 *trans*-splicing 산물은 리보자임과 표적 RNA 간의 특이적인 반응에 의한 결과물임을 알 수 있다. WT-P6HP8H 리보자임에 의한 *trans*-splicing 반응은 caffeine이 있을 경우엔 아무런 리간드가 없는 경우와 같이 거의 형성되지 않으나 theophylline이 존재할 때에는 caffeine 존재할 때보다 30배 이상 *trans*-splicing 반응이 더 잘 일어났다. 더구나 WT-P6HP8H 리보자임에 의한 theophylline 의존성 *trans*-splicing 반응은 WT 리보자임에 의한 *trans*-splicing 반응과 유사하도록 효과적으로 일어났다(Fig. 3C). 따라서 group I intron의 P6과 P8 domain 모두에 theophylline aptamer와 communication module 서열을 삽입 했을 때에는 보통 상태에서는 비활성화 상태로 존재하다 theophylline을 처리한 경우에만 allosteric하게 그리고 효과적으로 *trans*-splicing 반응이 유발되어 기질 RNA를 변형 시킬 수 있었다. 이 결과는 P6과 P8 domain 모두가 allosteric하게 리보자임 활성을 조절할 수 있는 주요 domain임을 시사한다.

Aptazyme에 *trans*-splicing 반응의 정확성

상기 결과로부터 theophylline aptamer가 P6과 P8 domain 모두에 부착된 group I 리보자임은 theophylline 의존적으로 *trans*-splicing 활성이 allosteric하게 유도될 수 있음을 알았다. 과연 이러한 *trans*-splicing 산물이 정확한 *trans*-splicing 반응에 의해 생성된 산물인지 검증하기 위하여 획득한 *trans*-splicing RT-PCR 산물의 염기서열을 결정하였다. 산물들 간의 염기 서열이 서로 다른지 알기 위하여 PCR 산물을 바로 sequencing하지 않고 pUC19 vector에 cloning 한 후 clone 20개를 얻은 후 각 clone들의 염기서열을 결정하였다(Fig. 4). 그림과 같이 *trans*-splicing 반응 산물을 sequencing 한 결과 모두 기질 RNA의 표적 부위 다음과 리보자임의 3' exon에 부착된 firefly luciferase RNA가 정확히 접합된 산물이었으며 이러한 결과는 *trans*-splicing aptazyme의 반응이 매우 정확히 일어남을 시사한다. WT 리보자임 및 WT-P6H, WT-P8H 리보자임에 의해 리간드 비특이적으로 형성된 *trans*-splicing 산물의 염기서열 결과도 역시 기질 RNA의 정확한 표적 부위와의 *trans*-splicing 반응의 결과였다(결과 미제시).

고 찰

최근 리보자임의 기질 결합 부위 또는 catalytic core 부위에 aptamer와 같이 특정 리간드와 결합하는 부위를 부착시에 특정 리간드 결합에 의해 리보자임의 구조적 변이를 유발함으로써 리보자임 활성을 allosteric하게 조절할 수 있는 리보자임 개발이 연구되고 있다(3, 18). 본 연구를 통하여 *Tetrahymena* group I intron의 P6 및 P8 도메인 모두에 aptamer를 부착시에 특정 리간드의 aptamer와의 결합에 의해 리보자임 구조를 비활성화 상태에서 활성화 상태로 변이시킬 수 있는 allosteric 리보자임으로 변환될 수 있음을 알았다. 이러한 결과는 RNA가 구조적으로 다 이내막한 특성을 함유함으로써 aptamer와 리보자임이라는 두 가지 다른 RNA 저해제들을 융합하여 새로운 구조적 특성 및 새

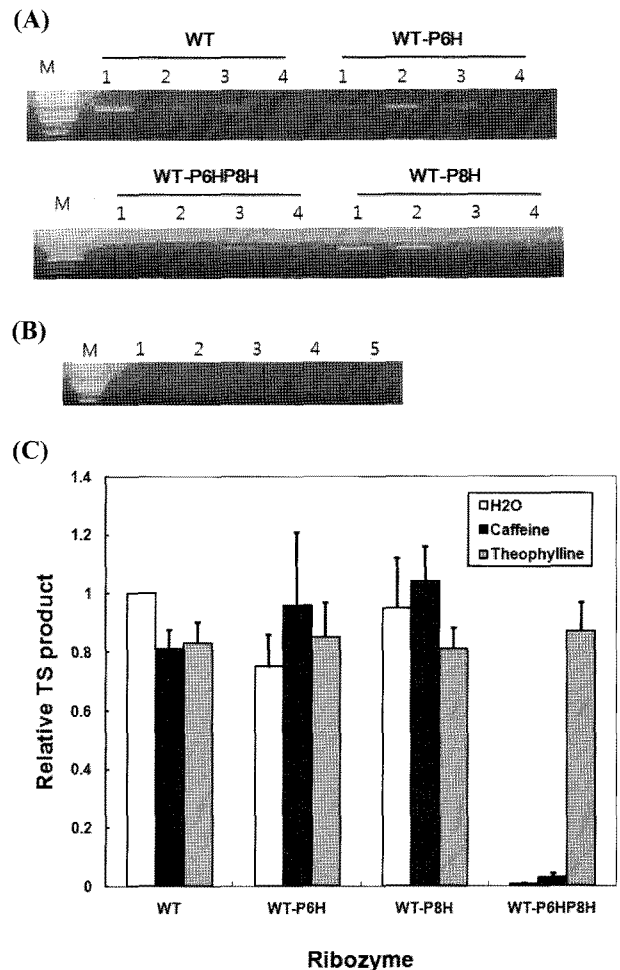


Fig. 3. Ligand-dependent *trans*-splicing reaction of the aptazyme. (A) WT, WT-P6H, WT-P8H, or WT-P6HP8H ribozyme was incubated with target RNA in the absence of any ligand (lane 1) or in the presence of caffeine (lane 2) or theophylline (lane 3). Resulting products were then amplified using RT-PCR and electrophoresed in 3% agarose gel. Ribozyme itself without substrate was amplified as control (lane 4). M represents 50 bp molecular weight size marker. (B) As controls, target HCV IRES RNA was incubated without any ribozyme (lane 1). In addition, nontarget EMCV IRES RNA was incubated with WT (lane 2), WT-P6H (lane 3), WT-P8H (lane 4), or WT-P6HP8H (lane 5) in the presence of theophylline. (C) Relative *trans*-splicing (TS) products by each ribozyme in the presence or absence of ligand was quantitated as a percentage of the sample reacted with WT ribozyme in the absence of any ligand. Values shown represent the means plus and minus standard deviation of three separate measurements.

로운 기능을 가진 유전 산물을 개발할 수 있음을 시사한다. 본 연구진은 이전 연구를 통하여 RNA aptamer에 ligand가 결합시에 aptamer의 구조적 변이를 유발할 수 있음을 알았으며 그러한 결과는 곧 구조적 변이에 의해 그 활성이 조절되는 aptazyme을 개발할 수 있는 이론적 근거가 될 수 있다(10). 특히 본 연구를 통하여 발견한 group I intron의 allosteric domain인 P6과 P8 부

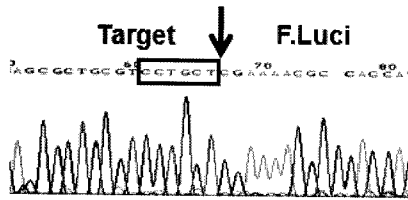


Fig. 4. Specificity of ligand-dependent *trans*-splicing reaction by WT-P6HP8H. *Trans*-spliced transcripts from reaction with WT-P6HP8H and target RNA in the presence of theophylline (Fig. 3A) were amplified and 20 products were cloned. A representative sequence of the reaction products was presented. The expected sequence around the splicing junction is indicated with an arrow, with the ribozyme recognition site in the target RNA boxed.

위에 다른 리간드에 대한 aptamer와 communication module의 삽입, 즉 modular engineering을 통하여 다양한 리간드에 대한 allosteric *trans*-splicing 리보자임 개발이 가능할 것으로 예상된다.

향 후 HCV 복제의 주요 조절 단백질에 대한 aptamer (10)와 communication module을 allosteric 도메인에 부착하여 HCV 조절 단백질이 존재해야만 *trans*-splicing 리보자임의 RNA 치환 활성이 allosteric하게 유도될 수 있는 *trans*-splicing aptazyme을 개발한다면 aptamer에 의해 HCV 조절 단백질을 sequest할 뿐만 아니라 HCV 조절 인자가 발현되어 작동하는 부위로 리보자임의 localization을 집중함으로써 리보자임의 표적 RNA (HCV 유전체)에 대한 접근성을 증가, 리보자임의 세포 내 활성을 보다 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한 HCV 조절 인자 의존적으로 리보자임의 활성을 조절함으로써 off-target과 같은 비특이적인 리보자임 활성을 억제할 수 있을 것이며 리보자임의 catalytic 기능에 의해서 aptamer가 가역적으로 리간드와 반응한다 하여도 비가역적으로 리보자임이 표적 RNA를 제거함으로써 항 HCV 기능이 증가되고 동시에 바이러스 감염세포를 제거할 수 있는 항바이러스 유전자 산물의 유도를 피할 수 있는 등 보다 특이성과 효능이 개선된 항 HCV 제제 개발이 가능할 것이다. 나아가 *trans*-splicing aptazyme의 리간드 의존성 활성 유도 성질을 이용, HCV 조절 인자에 특이적으로 결합할 수 있는 small drug 또는 단백질-단백질 상호반응을 할 수 있는 HCV 조절 인자 결합 단백질 등을 고속 그리고 대량으로 스크리닝할 수 있는 시스템으로도 활용이 가능할 것이다.

감사의 말

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-041-C00340).

참고문헌

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chevalier, C., A. Saulnier, Y. Benureau, D. Fléchet, D. Delgrange, F. Colbère-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.
- 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.
- Hahn, B., D.S. Han, S.H. Back, O.K. Song, M.J. Cho, C.J. Kim, K. Shimotohno, and S.K. Jang. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. 1995. *J. Virol.* 69, 2534-2539.
- Hermann, T. and D.J. Patel. 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287, 820-825.
- 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.
- 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.
- Jenison, R.D., S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263, 1425-1429.
- 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.
- Kertsburg, A. and G.A. Soukup. 2002. A versatile communication module for controlling RNA folding and catalysis. *Nucleic Acids Res.* 30, 4599-4606.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

18. Penchovsky, R. and R.R. Breaker. 2005. Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nat. Biotechnol.* 23, 1424-1433.
19. Penin, F., J. Dubuisson, F.A. Rey, D. Moradpour, and J.M. Pawlotsky. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.
20. Pley, H.W., K.M. Flaherty, and D.B. McKay. 1994. model for an RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and an RNA helix. *Nature* 372, 111-113.
21. 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.
22. Ryu, K.J. and S.W. Lee. 2004. Comparative analysis of intracellular *trans*-splicing ribozyme activity against hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J. Microbiol.* 42, 361-364.
23. 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.

(Received September 4, 2008/Accepted September 26, 2008)

ABSTRACT: Development of *Trans*-Splicing Aptazyme Which Can Specifically Modify Hepatitis C Virus Genome

Ju Hyun Kim, Sun Young Jang, Chang Ho Lee, and Seong-Wook Lee* (Department of Molecular Biology and Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yon-gin 448-701, Republic of Korea)

For the development of specific and effective basic genetic materials to inhibit replication of hepatitis C virus (HCV), HCV genome-targeting *trans*-splicing aptazyme, which activity is allosterically regulated by a specific ligand, was developed. The aptazyme was designed to be comprised of sequence of RNA aptamer to the ligand, communication module sequence which can transfer structural transition for inducing ribozyme activity upon binding the ligand to the aptamer, and *trans*-splicing ribozyme targeting +199 nt of HCV IRES. Especially, when the aptamer and the communication module was inserted at both P6 and P8 catalytic domain of the specific ribozyme, allosteric activity of the aptazyme was the most induced. The aptazyme was shown to induce activity of *trans*-splicing reaction specifically and efficiently only in the presence of the specific ligand, but neither in the absence of any ligand nor in the presence of control ligand. This aptazyme can be used as a specific and effective genetic agent against HCV, and a tool for the isolation of anti-HCV lead compounds.