

(중과제명)
물질대사 조절기능 연구

(세부과제명)
대사유전에 관한 연구

The Metabolic Basis of Human Inheritance

연구기관
한국과학기술원

과 학 기 술 처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “대사유전에 관한 연구” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

1997. 7. 30.

주관연구기관명 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 강 계 원

연 구 원 : 김 선 창

“ : 정 재 훈

“ : 이 균 민

“ : 안 정 근

“ : 조 철 오

“ : 최 준 호

“ : 이 영 훈

요 약 문

I. 연구제목

대사 유전에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

세포 내에서 일어나는 다양하고 복잡한 대사에 의하여 생명체는 생명현상을 영위할 수 있다. 이러한 대사의 조절에 관한 연구는 생명현상에 대한 학문적 이해를 높이는 측면이 아니라 일부 대사과정의 이상으로 인해 발생할 수 있는 수많은 질병에 대한 치료와 예방을 위해서도 필요하다. 본 연구에서는 생체의 대사에 관련된 질병의 예방 및 치료법 개발에 대한 기초 연구를 수행하고 이러한 대사조절 연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry를 도입하려 하였다.

III. 연구개발 내용과 범위

본 연구에서는 첫째, 생체의 대사를 관장하는 유전체계를 규명하고 이와 관련된 각종 질병의 예방 및 치료법 개발에 대한 기초자료를 구축하고 둘째, 물질대사 조절연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry을 이용하기 위한 기초 연구를 시도하였고 셋째, 이를 근거로 하여 oligonucleotide combinatorial library에서 물질대사 조절에 응용할 수 있는 aptamer를 선별하고 그 특성을 조사하였다.

IV. 연구개발 결과 및 연구 개발 결과의 활용계획

본 연구의 1차 년도 연구에서는 물질 대사 조절에 관한 기초 자료를 얻기

위하여 1) 항혈전 단백질을 분리 정제하여 그 특성을 조사하였고, 2) Cre/lox site-specific recombination system을 이용하는 방법을 이용한 유전병 관련 유전자의 분리 기술을 개발하였고, 3) CV-1, NIH3T3 cell을 이용하여 retroviral vector의 고농도 생산을 위한 최적화를 시도하였으며, 3) ICP4 및 thymidine kinase promoter의 활성 조절을 통하여 단순 포진 바이러스의 핵산 대사 조절 기작을 조사였고, 4) 바이러스와 화학적 발암원에 의해 각각 암화된 배양세포에서 이노시톨 인지질대사의 변화 및 이차신호 전달물질인 IP3의 양을 측정하였으며 tumor promoter인 TPA를 배양세포에 처리하여 간극 연결을 통한 세포간 신호전달의 투과도를 조사하였고, 5) 물질대사연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry을 응용하기 위하여 사용할 oligonucleotide combinatorial library를 제조하였다. 2차 년도에서는 oligonucleotide combinatorial chemistry의 응용을 위한 모델시스템으로 RNase P의 단백질 성분인 C5 protein을 target 단백질로 이용하였다. SELEX를 이용하여 oligonucleotide combinatorial library로 부터 C5 protein에 specific하게 결합하는 RNA aptamer를 선별하였으며 이러한 RNA aptamer의 특성을 조사하여 aptamer 선별을 위한 SELEX 방법을 검증하였다. 또한 oligonucleotide combinatorial chemistry를 적용할 대사조절 관련 단백질인 신생혈관 유도인자 (angiogenin)와 HCV RNA helicase를 분리 정제하였다. 3 차년도에서는 1) 신생혈관 유도인자에 대한 DNA aptamer를 선별하여 그 특성을 조사하였고, 2) HCV RNA helicase에 대한 RNA aptamer를 선별하여 그 특성을 조사하였다.

생체내 물질대사의 조절인자를 선별하기 위하여 확립된 aptamer 기술은 물질 대사 조절 메카니즘을 연구하는데 이용할 수 있을 뿐 아니라 이 방법을 통하여 새로운 기능을 가지는 분자를 무한히 창출할 수 있고, 분자인식 메카니즘, 구조-기능 상관관계, 더 나아가 생명 현상과 생명의 기원에 대한 근원적 해답을 얻을 수 있다.

S U M M A R Y

1. Title

The metabolic basis of human inheritance

2. Specific Aims and Significance

Living organisms maintain their living status through a variety of complex metabolism occurring inside the cell. Studies on regulation of the metabolism are essential for developing therapeutic and preventive strategies against a number of diseases caused by internal or external factors in the cellular metabolism as well as for understanding molecular basis of life. The objective of this study is to investigate basic principles in the regulation of metabolism for the development of therapeutic and to apply oligonucleotide combinatorial chemistry for studies on regulation of cellular metabolism.

3. Scope of Research

In this study, 1) we focused on the investigation of internal and external factors including genetic factors in the cellular metabolism for developing therapeutic and preventive strategies against metabolism-related diseases, 2) we developed a model system for applying oligonucleotide combinatorial chemistry to study regulation of cellular metabolism, and 3) on the basis of this result, we applied oligonucleotide combinatorial chemistry to examine metabolic basis and develop therapeutic and preventive strategies against metabolism-related diseases.

4. Results and Prospects

In the first research year, we carried out the following experiments to obtain basic information about regulation of cellular metabolism: 1) new proteolytic enzyme inhibitors were purified and characterized; 2) Cro/lox site-specific recombination system was developed for the isolation of genes causing diseases; 3) production of retroviral vectors in CV-1 and NIH3T3 cells was optimized; 4) change of nucleic acid metabolism caused by Herpes simplex virus was examined by analyzing regulation of activities of the ICP4 and thymidine kinase promoters; 5) Inositol phospholipid metabolites were analyzed in virally and chemically transformed cells and gap junctional communication was measured in TPA-treated cells by scrape-loaded dye transfer method; 6) a oligonucleotide combinatorial library was constructed which was used for selection of aptamers binding to target molecules involved in cellular metabolism. In the second research year, a model system for application of oligonucleotide combinatorial chemistry in studying regulation of cellular metabolism was established using C5 protein, the protein component of RNase P. RNA aptamers binding to C5 protein were selected by SELEX and their properties were characterized. Metabolism-related target proteins such as angiogenin and HCV RNA helicase were purified for selection of aptamers binding to the proteins by a working SELEX protocol on the basis of the model system for RNA aptamers binding to C5 protein. In the third research year, we selected 1) DNA aptamers binding to angiogenin and 2) RNA aptamers binding to HCV RNA helicase, and 3) characterized properties of the selected aptamers.

The aptamer technology which was established in this study not only can be used for studying regulation of cellular metabolism but also can provide a method for creation of novel functional molecules that are at present beyond imagination. An extension of this study may answer questions about molecular recognition mechanisms, relationship between structure and function of molecules, and the origin of life and evolution.

CONTENTS

Chapter I. Introductory Remarks / 1

1. Specific Aims and Scope / 1
2. Background / 1

Chapter II. Anticoagulant Agent and Protease inhibitors / 5

1. Introduction / 5
2. Methods and Results / 6
3. Results and Conclusion / 10

Chapter III. Cre/lox Site Specific Recombination System for Cleavage for Chromosomal DNA / 23

1. Introduction / 23
2. Results / 24
3. Discussion / 30

Chapter IV. Mass Production of Retroviral Vector / 32

1. Introduction / 32
2. Materials and Methods / 34
3. Results and Discussion / 35

Chapter V. Regulation of DNA Metabolism of HSV

***In Vivo* / 40**

- 1. Introduction / 40**
- 2. Materials and Methods / 44**
- 3. Results and Discussion / 45**
- 4. References / 46**

**Chapter VI. Alteration of Inositol Lipid Metabolism
during Carcinogenesis / 50**

- 1. Introduction / 50**
- 2. Materials and Methods / 52**
- 3. Results / 54**
- 4. Discussion / 59**
- 5. References / 61**

**Chapter VII. Model System for Aptamer Technology:
Selection and Characterization of RNA Aptamer
Binding to C5 Protein, the Protein Component of
RNase P / 65**

- 1. Introduction / 65**
- 2. Materials and Methods / 68**
- 3. Results and Discussion / 74**
- 4. References / 90**

Chapter VIII. Selection and Characterization of DNA

Aptamer Binding to Angiogenin / 92

1. Introduction / 92
2. Materials and Methods / 93
3. Results and Discussion / 101
4. References / 108

Chapter IX. Selection and Characterization of RNA

Aptamer Binding to HCV RNA Helicase / 110

1. Introduction / 110
2. Materials and Methods / 112
3. Results / 116
4. Discussion / 126
5. References / 127

목 차

제 1 장 서론 / 1

제1절 연구개발의 목적과 범위 / 1

제2절 연구배경 / 1

제 2 장 혈액응고 및 단백질 분해효소 / 5

저해제에 관한 연구

제1절 서설 / 5

제2절 재료 및 방법 / 6

제3절 결과 및 결론 / 10

제 3 장 Cre/Iox site specific recombination을 이용한

염색체 DNA의 절단 및 표지에 관한 연구 / 23

제1절 서설 / 23

제2절 연구 결과 / 24

제3절 고찰 / 30

제 4 장 Retroviral vector의 고농도 생산 / 32

제1절 서설 / 32

제2절 재료 및 방법 / 34

제3절 결과 및 고찰 / 35

제 5 장 단순포진 바이러스의 생체내 핵산대사 조절 / 40

제1절 서설 / 40

제2절 재료 및 방법 / 44

제3절 결과 및 고찰 / 45

제4절 참고 문헌 / 46

제 6 장 암세포 분화시 이노시톨 인지질 대사의 변화 / 50

제1절 서설 / 50

제2절 재료 및 방법 / 52

제3절 결과 / 54

제4절 고찰 / 59

제5절 참고 문헌 / 61

제 7 장 Aptamer 기술의 모델시스템:

RNase P의 단백질 성분에 결합하는 RNA aptamer의

선별 및 특성 / 65

제1절 서설 / 65

제2절 재료 및 방법 / 68

제3절 결과 및 고찰 / 74

제4절 참고 문헌 / 90

**제 8 장 혈관유도인자의 활성을 조절하는 DNA aptamer의
선별 및 특성 / 92**

제1절 서설 / 92

제2절 재료 및 방법 / 93

제3절 결과 및 고찰 / 101

제4절 참고 문헌 / 108

**제 9 장 HCV RNA helicase의 활성을 조절하는
RNA aptamer의 선별 및 특성 / 110**

제1절 서설 / 110

제2절 재료 및 방법 / 112

제3절 결과 / 116

제4절 고찰 / 126

제5절 참고 문헌 / 127

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

세포내에서 일어나는 다양하고 복잡한 대사에 의하여 생명체는 생명현상을 영위할 수 있다. 이러한 대사의 조절에 관한 연구는 생명현상에 대한 학문적 이해를 높이는 측면이 아니라 일부 대사과정의 이상으로 인해 발생할 수 있는 수많은 질병에 대한 치료와 예방을 위해서도 필요하다. 본 연구에서는 생체의 대사에 관련된 질병의 예방 및 치료법 개발에 대한 기초 연구를 수행하고 이러한 대사조절 연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry를 도입하려 하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 첫째, 생체의 대사를 관장하는 유전체계를 규명하고 이와 관련된 각종 질병의 예방 및 치료법 개발에 대한 기초자료를 구축하고 둘째, 물질대사 조절연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry을 이용하기 위한 기초 연구를 시도하였고 셋째, 이를 근거로 하여 oligonucleotide combinatorial library에서 물질대사 조절에 응용할 수 있는 aptamer를 선별하고 그 특성을 조사하였다.

제 2 절 연구배경

생명체는 분화, 발달, 성장 및 생식에 이르는 기본적인 생명 현상의 영위에 필요한 물질을 만들고 에너지를 얻기 위해 대사라는 과정을 거친다. 생체내에서 일어나는 수백 수천 종류의 복잡한 대사도 결국은 유전자로 부터 만들어진 단백질에 의하여 조절되기 때문에 생명현상에 대한 학문적 이해를 높이는

측면뿐 아니라 일부 대사를 관장하는 유전자들의 기능과 이들의 조절 메카니즘을 밝히는 것은 생명과학의 가장 기본적이고 중요한 연구 주제라 할 수 있다. 그러므로 유전적 요소 또는 바이러스의 침입에 의한 물질 대사의 이상으로 나타나는 질병의 원인을 규명하기 위해서는 물질대사에 직접 관련하는 세포인자와 이들의 기질에 대한 생물학적 특성의 연구가 절실히 필요하다. 본 연구에서는 단백질 대사 질환에 관련된 유전자의 분리 방법 개발, 혈액응고 기작에 관련된 단백질 대사 및 혈액 응고 관련 질환에 대한 연구 및 치료제 개발, 유전자 치료용 retroviral vector의 고농도 배양, 단순포진 바이러스의 유전대사의 이해, 인지질 대사 물질의 세포내 전달기작 연구 등을 수행하고, 이러한 대사를 조절할 수 있는 핵산성 조절제를 개발하기 위하여 oligonucleotide combinatorial chemistry의 응용에 대한 연구를 시도하였다.

Oligonucleotide combinatorial chemistry는 무작위로 합성된 핵산 (DNA 또는 RNA) 집합체로부터 특정기능을 하는 핵산을 선별하는 연구분야이다. RNA 또는 단일 가닥 (single-stranded) DNA가 기능을 할 수 있는 이유는 이러한 핵산이 단일가닥으로 되어 있기 때문에 단백질과 매우 유사한 방법으로 삼차구조적 접힘 (folding)이 가능하기 때문이다. 이러한 삼차원 구조는 단백질의 구조가 아미노산 서열에 의하여 결정되는 것처럼 염기서열에 따라 결정될 것이다. 이와 같이 핵산도 다양한 삼차원 구조를 형성할 수 있으므로 단백질과 유사한 성질을 가질 수 있다. 최근 이러한 기능성 핵산을 찾는 연구는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라 하는 시험관 내 선택법 (in vitro selection)을 통하여 시도되고 있다. SELEX는 무작위로 합성된 핵산 집합체 ($10^{13} \sim 10^{15}$ 개의 분자)로 부터 특정한 효소 기능을 갖는 핵산 또는 특정 수용체 (receptor)에 결합하는 리간드 기능을 갖는 핵산을 분리 및 증폭할 수 있다. 이러한 방법으로 단백질과 같이 다양한 기능을 할 수 있는 핵산 (이러한 특정 분자에 결합하는 핵산은 aptamer라 명명되었음)을 선별할

수 있다. 이러한 oligonucleotide combinatorial chemistry 또는 aptamer 기술을 대사조절 연구에 적용하기 위한 모델시스템으로 RNase P의 단백질 성분인 C5 protein을 target으로 하여 C5 protein에 결합하는 RNA aptamer를 선별하고 이들의 특성을 밝힘으로써 aptamer 기술을 확립하려고 하였다. 모델 시스템으로 C5 protein을 선택한 이유는 리보핵산단백질 (ribonucleoprotein)인 RNase P의 구조와 기능을 통하여 aptamer의 활성을 쉽게 평가할 수 있고 이 연구과정에서 합성된 핵산 집합체와 개발된 aptamer 기술의 타당성이 확인될 수 있기 때문이다. 이렇게 확립된 aptamer 기술은 대사 조절에 관련된 단백질을 target으로 연구에 직접 사용될 수 있을 뿐 아니라 RNase P에서 단백질과 RNA 상호작용 연구에 중요한 정보를 제공하여 줄 수 있다.

인체내 물질대사는 내부적 또는 외부적인 요인에 의하여 변화될 수 있기 때문에 다양한 요인들에 의하여 여러가지 질병이 유발될 수 있다. 이러한 대사 조절 연구에 oligonucleotide combinatorial chemistry를 적용하기 위하여 target 단백질로는 angiogenin과 HCV RNA helicase를 사용하였다.

신생혈관 유도인자인 angiogenin은 1985년 하버드 대학의 Vallee 박사팀이 최초로 발견한 이후에 이 분야에 대한 관심이 집중되기 시작하였다. 그후 다른 신생혈관 유도 인자들이 발견되었으며 각국의 제약회사들이 신생혈관 유도 억제제의 개발 및 스크리닝에 많은 투자를 하고 있다. 신생혈관을 억제시키는 물질의 개발 및 발견은 불필요한 신생혈관에 의하여 생기는 여러 질병 특히 신생혈관 유도가 절대적으로 필요한 악성종양의 치료에 응용될 수 있으므로 중요한 연구과제라 할 수 있다. 해당 관련 질병으로는 각막이나 수정체에 혈관이 형성되어 실명하는 경우나 연골쿠션에 과다하게 혈관이 형성되어 관절염이 생기는 경우, 또는 허파에 혈관종이 생겨 생명에 위협을 주는 경우, 후천성 면역결핍환자의 피부에 자라는 카포시 육종 등이 있다. 지금까지 발견되거나 개발된 혈관 유도 억제제는 혈소판 인자-4, 푸마길린과 이의 유도체, 금속함유 단백질 분

해효소의 조직억제제-2, TAN-1323C 등이 있다. 현재 사용되는 항암제는 비특이적인 이유로 많은 부작용이 있다. 반면 신생혈관 유도가 암세포 성장 및 전이에 필수적이라는 사실을 감안하여 개발되는 항암제는 근본적으로 접근 방법이 다르기 때문에 부작용이 적고 훨씬 효과적일 것으로 예상할 수 있다. Angiogenin에 결합하는 aptamer의 개발은 단백질 억제제 보다 안정하고 면역 거부 반응도 거의 없으므로 관련된 질병의 치료제로 이용될 수 있는 장점을 가지고 있다.

HCV (C형 감염 바이러스)는 간경화나 간암을 유도하는 질병원이다. HCV 감염에 대한 효과적인 치료제의 아직 없는 상태이다. HCV 감염의 치료제 개발의 접근 방법중의 가장 효율적인 방법은 HCV의 life cycle에서 특이한 대사과정을 억제하는 물질을 개발하는 것이다. 이중에서 HCV RNA helicase는 HCV의 RNA genome을 복제하기 위한 전 단계로 RNA helix를 풀어주는 역할을 한다. HCV RNA helicase가 기질로 RNA를 사용한다는 사실로부터 이 RNA helicase에 매우 강하게 결합하는 RNA aptamer를 선별한다면 이러한 RNA aptamer는 HCV RNA helicase에 specific하게 결합하여 HCV replication을 억제할 수 있다. 이러한 RNA aptamer를 이용하여 HCV 감염을 치료할 수 있는 치료제로 개발할 수 있다. 또한 aptamer는 응용 분야에 적용할 수 있을 뿐 아니라 학술적으로도 선별된 RNA aptamer의 특성으로부터 아직 밝혀지지 않은 HCV RNA helicase의 작용 메카니즘에 대한 정보를 얻을 수 있다.

제 2 장 혈액응고 및 단백질 분해효소

저해제에 관한 연구

제 1 절 서설

이 지구상에는 leeches, vampire bats, ticks, fleas, bedbugs, mosquitoes 등과 같은 많은 흡혈 동물들이 존재한다. 이들은 양분의 흡수를 흡혈이라는 형태로 오랫동안 진화해 온 것이다. 그 결과 흡혈 동물들은 흡수한 피가 응고되지 않도록 하기 위한 다양한 anticoagulant agent들을 만들게 되었다. 그러한 흡혈동물 중 가장 잘 알려진 것 중의 하나로 거머리(leech)는 이미 19세기부터 의약용으로 많이 사용되어 왔다. 거머리는 다른 동물과는 달리 소화효소는 적게 가지고 있으나 숙주의 haemostatic mechanisms을 극복할 수 있는 성질들을 많이 가지고 있다. 그러한 성분들 중 hirudin은 leech saliva에 존재하는 대표적인 항혈전제이다. 그것은 anticoagulant로 혈액응고를 촉매하는 효소인 thrombin을 억제하여 혈액응고를 막는 작용을 한다. 그 밖에도 많은 유용한 성분들이 거머리로부터 분리되고 있으며 대표적인 것들을 아래 table에서 열거하였다.

Bioactive substances from leeches.

Name	Activity
Antistasin	Inhibitor of blood factor Xa
Apyrase	Cleaves phosphate from ADP/ATP
Bdellin	Inhibitor of Trypsin, plasmin

Bufrudin	Inhibitor of thrombin
Calin	Inhibitor of collagen/platelet interaction
Ceramide glycanase	Cleaves carbonhydrates from glycosphingolipids
Decorsin	Glycoprotein IIb/IIIa antagonist
Eglin	Inhibitor of elastase, chymotrypsin
Gelin	Inhibitor of elastase, chymotrypsin
Ghilanten	Inhibitor of blood factor Xa
Hementin	Fibrine(geno)lysin
Hirudin	Inhibitor of thrombin
Orgelase	Hyaluronic acid-specific hyaluronidase

제 2 절 재료 및 방법

1. 연구재료의 채집 및 사육

본 실험실의 연구원과 각 지방의 협조자를 통해 전국적으로 서식하는 거머리를 부분적으로 계속 채집하였다. 채집방법은 수면에 파랑을 일으켜 거머리를 유인하여 잡았다. 잡아온 거머리는 거머리 성장에 필요한 이온이 첨가된 용액에 넣고 온도를 조절하면서 사육하며, 번식을 시켰다. 흡혈 거머리는 피를 먹이로 하므로, 먹이로 돼지나 소의 피를 membrane에 넣어 먹였다.

2. 침샘 분비물에서 여러 단백질의 활성 측정

혈액응고억제 활성을 측정하기 위해 microplate에 50 μ l의 침샘 분비물 혹은 거머리 추출물과 0.2 unit의 thrombin 50 μ l을 잘 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응

시키고 200 μM thrombin specific substrate(chromozym TH)를 100 μl 첨가한 후 microplate reader로 405 nm에서 측정하였다. 시간에 따른 흡광도의 변화를 graph에 나타내어 liner range에 잇는 값을 이용, antithrombin 활성을 계산하였다 ($\Delta A_{\text{hirudin}}/\text{min} = \Delta A_{\text{TB}}/\text{min} - \Delta A_{\text{s}}/\text{min}$: ΔA_{TB} : thrombin base value ΔA_{s} : sample absorbance).

효소와 억제제의 활성도는 1 unit (=1 μM 의 기질이 분해되는 정도/1분)의 단위로 나타내었다. 다른 Elastase 나 Cathepsin G 같은 효소의 활성도 측정 방법도 거의 유사하다.

보통 침샘 분비물에는 작은 분자량의 단백질이 많이 존재하므로 먼저 Tricine-SDS-PAGE 와 Gel filtration (Sephadex G-75)을 통해 여러 단백질의 크기를 분석한다.

3. Antithrombin agent의 분리

항혈액응고 활성도는 거머리가 먹이를 먹지 못한 상태에서 더욱 강하게 나타난다. 이에 따라 거머리에게 한달이상 먹이를 주지않고 침샘내 항혈액응고 활성을 최대화 시킨 후 deep freezer에 보관하였다. 약 200 g의 거머리를 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 잘게 썰어 500 ml의 80%(v/v)의 cold acetone에 넣고 10분간 얼음위에서 잘 섞고, sodium chloride를 최종 0.5 M로 첨가하여 항트롬빈을 추출하고 다시 여기에 trichloroacetic acid를 최종 0.2 M 농도로 첨가하여 1시간 동안 추출하였다. 용출액을 high speed centrifuge로 원심분리하고 (5,000 g) 침전되는 분획을 다시 100 ml의 NaCl 과 TCA가 포함되어 있는 80% cold acetone으로 추출하였다. 이 추출용액에 2배의 cold acetone을 첨가하고 나서 -10 $^{\circ}\text{C}$ 에 30분이상 방치하여 단백질을 침전시키고 침전물을 원심분리하였다. 이 침전물을 cold acetone으로 씻어낸 후 다시 25 mM ammonium acetate buffer pH 6.9에 용해시켰다. 녹지 않는 찌꺼기를 버리고 cold ethanol 이나 cold acetone으로 단백

질을 다시 침전시켜 용매를 진공건조시켰다. Crude 추출물을 2.5 x 20 cm의 DEAE-Sepharose 칼럼 (0.02 M acetate buffer pH 6.9)에 loading하여 equilibration buffer로 washing 하고, 같은 buffer로 0-1.0 M NaCl 농도구배를 주어 용출하였다. 활성을 보이는 fraction을 모아 YM03 Ultrafiltration으로 농축을 하고 0.02 M acetate buffer pH 6.9로 equilibrated 된 1.6 x 100 cm의 sephadex G-75 column에 gel filtration을 수행하였다. 활성을 보이는 분획을 모아 다시 ultrafiltration으로 농축시켰다.

Affinity column을 만들기 위해서 Sigma에서 구입한 bovin thrombin (10,000 units)을 dialyze 하고 여기에 1 mM HCl로 충분히 씻어준 CNBr-Sepharose를 섞어 16시간 이상 4°C에서 반응을 시키면 thrombin-Sepharose가 만들어진다. Cross-linked resin을 0.1 M acetate buffer pH 4.0 과 0.1M Tris-Cl pH 8.0으로 번갈아 가면서 세 번정도 washing 하였다. 그후 Thrombin-sepharose affinity 기질을 1 x 10 cm의 칼럼에 packing하고 0.1 M Tris/HCl Buffer pH 8.0으로 equilibrate 시켰다. 부분적으로 분리된 fraction을 이 buffer 500 µl에 녹인 후 칼럼에 loading 하였다. 칼럼을 같은 buffer로 씻어 내고, 결합된 분자를 0.1M 4-aminobenzamidine/20mM HCl로 용출하였다. 3-4 칼럼부피의 용출된 fraction들을 모아 Sephadex G-25 coarse gel filtration column으로 desalting하고 동결건조하였다. 이 sample을 다시 200 µl의 0.1% TFA에 녹인 후 100 µl 의 sample을 reverse phase C18 column에 loading하여 0 - 60% acetonitrile, 0.09% TFA의 농도구배로 용출하였다. 흡광도는 214 nm 에서 측정하며 각 fraction의 항 트롬빈 활성을 측정한다.

4. SDS-PAGE 와 Electroblothing

Sample을 16.5% Tricine-PAGE로 전기영동한 후 gel을 transfer buffer (10 mM) 3[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid, 10% methanol, pH 11.0)

에 5분간 방치하여 Tris 와 glycerol을 제거하였다. PVDF membrane은 100% methanol로 씻어 미리 transfer buffer에 담그어 놓았다. Gel을 PVDF가 들어 있는 blotting apparatus 에 끼워넣고 transfer buffer에서 0.5 A로 10분에서 30분동안 electroelution 하였다. Running 이 끝난 후, PVDF membrane을 2차 증류수에 5분간 씻고 0.1% coomassie Blue R-2500, 50% methanol에 5분간 담그고 50% methanol, 10% acetate에 5분에서 10분동안 destain하였다. Membrane은 마지막으로 2차 증류수에 5분간 씻고 공기중에 말려 -20℃에 보관하였다.

5. 아미노산 서열 분석

PVDF membrane에 band로 나타난 단백질을 면도날로 도려내어 Teflon seal로 중심을 맞추고 sequenator의 cartridge block에 잘 녹는다. 단백질은 Applied Biosystems model 470 sequenator에서 그 서열을 분석하였고, PTH-derivatives는 reverse-phase HPLC로 분석하였다. 약 1.5 µg의 reduced, S-pyridylethylated protein을 6 M HCl에서 24시간동안 110℃로 가열하여 가수분해한 후 DABS-Cl 로 derivatize 한다.

N-terminal sequence는 0.1-0.5 nmol의 단백질을 Applied Biosystems gas-phase sequencer에 apply하여 PTH amino acid derivatives를 분석한다.

아미노산의 서열이 분석되면 이미 알려진 여러 가지 히루딘 변이형 (Transgene HV2: gene-synthesis, Tolstoshev P et al.; Transgene HV2: modified, by gene synthesis, Tolstoshev et al.; Hirudin PA: Dodt et al.; natural, Hirudin: Petersen et al.; Dodt, natural Hirudin: Brauer D et al.)의 아미노산 서열과 비교하여 단백질의 1차 구조의 유사성을 조사하고, 이러한 변이형들의 활성도가 차이가 나는 이유를 알아본다.

6. 질량분석

분리된 트롬빈 억제제를 기초과학지원센터의 MALDI Mass spectrometer를 이용하여 정확한 질량을 분석하였다. 이때 matrix로는 산성의 sinapinic acid를 이용하였다.

제 3 절 결과 및 결론

1. 결 과

가. 거머리의 Crude Extract에서 단백질 분해효소 억제제의 활성 측정

흡혈종의 경우 thrombin inhibitor 활성이 강하게 나타났고, elastase inhibitor의 활성도 역시 강하게 측정되었다. Thrombin 억제제의 활성 측정은 chromozym TH라는 chromogenic substrate를 이용하여 thrombin에 의해 분해되는 양을 ELISA reader에서 측정하였고, Elastase 억제제의 활성도는 azocasein을 substrate로 사용하여, elastase에 의해 분해되는 azocasein의 product를 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 그림 1과 같다.

나. Antithrombin agent의 분리

(1) Extraction

거머리 몸의 머리 부분 1/3 정도를 잘라내어 (200g) 80% aqueous acetone에서 homogenize한 후 0.5M NaCl 과 0.3M TCA를 첨가하여 pH 3.0정도로 30

Thrombin assay

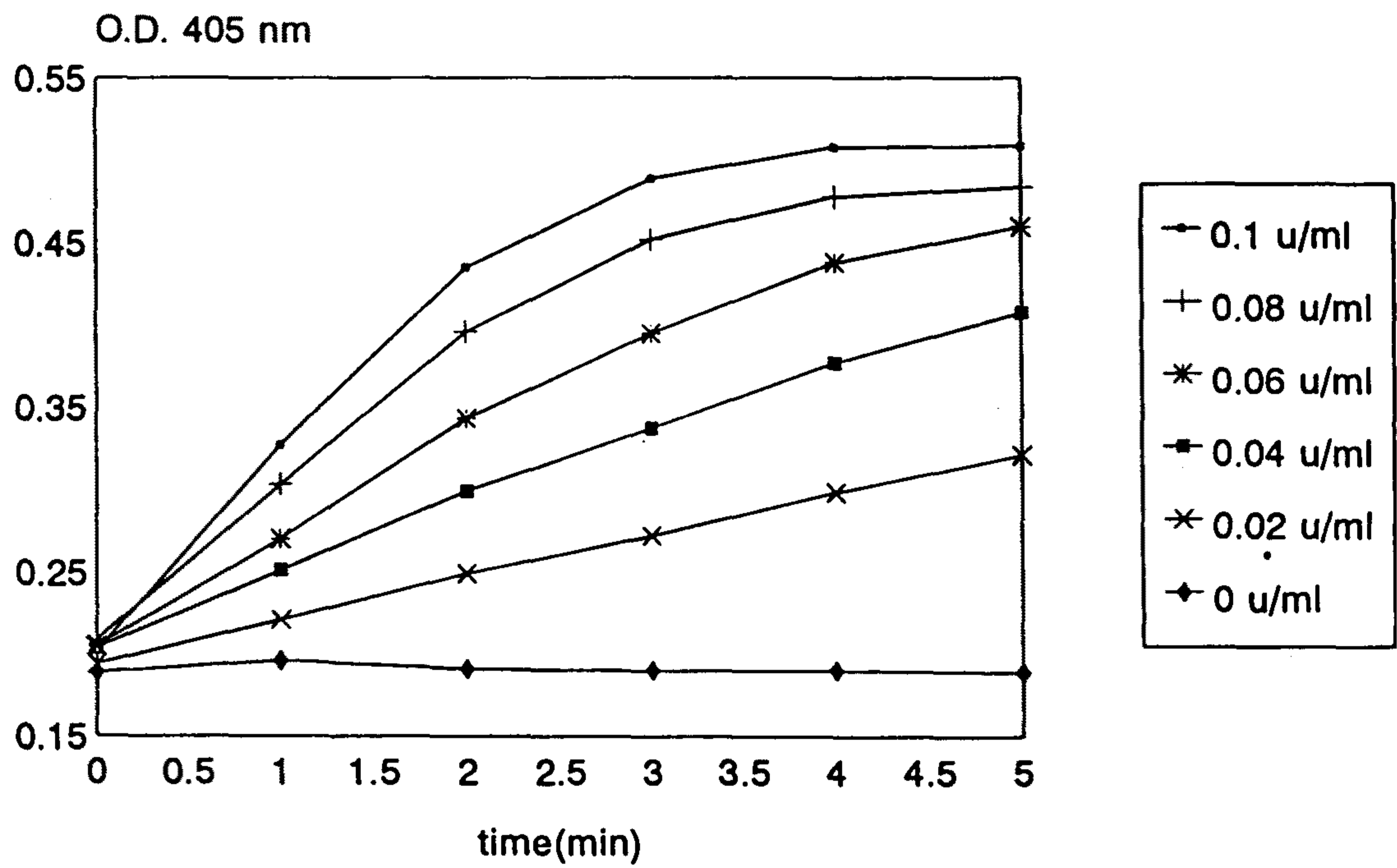


그림 1. Thrombin Standard Assay

Thrombin의 specific activity에 따라 위 그림과 같은 profile을 얻을 수 있다.

분간 extraction하였다. 찌꺼기는 거름종이에 걸러 다시 한번 위 과정을 반복하였다. 이 두분획을 한로 모아 여기에 100% acetone(-10℃)을 첨가하여 단백질을 침전시키고 원심분리기로 15분 동안 centrifuge한 후 침전물을 수확하였다. Total Crude Extract의 양 : 1.82 g

(2) Anion Exchange Chromatography

20mM ammonium acetate pH 6.87로 미리 equilibrate 되어있는 DEAE-Sepharose CL-6B (2 x 20cm)에 crude extract를 loading 하였다. 같은 buffer로 용출액의 O.D. 254 nm가 0.1 이하가 될 때까지 washing 한 후, gradient maker로 0 M-1 M의 NaCl로 용출하였다. (그림 2). 그 결과 0.3 M NaCl부터 0.55 M NaCl 이온 농도에서 thrombin을 억제하는 성분이 용출된다는 것을 알 수 있었다. 총 160 ml의 활성 분획들을 YM03 membrane을 이용하여 ultrafiltration으로 5 ml 까지 농축시켰다.

(3) Gel Filtration

DEAE-Sepharose에서 활성이 나타난 분획을 농축시켜 25 mM ammonium acetate buffer (pH 6.9)로 equilibrated 된 Sephadex G-75 (medium, 1.6 x 73 cm) column에 gel filtration 하였다. Flow rate는 0.5 ml/min으로 고정하였고, 용출 후 각 분획에 대한 thrombin inhibiting activity를 측정하였다. (그림 3) 활성도를 나타내는 분획은 15번 분획부터 23번 분획까지 총 36 ml 이었다. 이를 다시 YM03 membrane으로 ultrafiltration 하여 5 ml까지 농축하였다.

(4) Thrombin-Sepharose Affinity Chromatography

Thrombin을 CNBr-Sepharose에 결합시켜 0.6 x 5 cm되는 column에

DEAE - Sepharose (Ion Exchange)

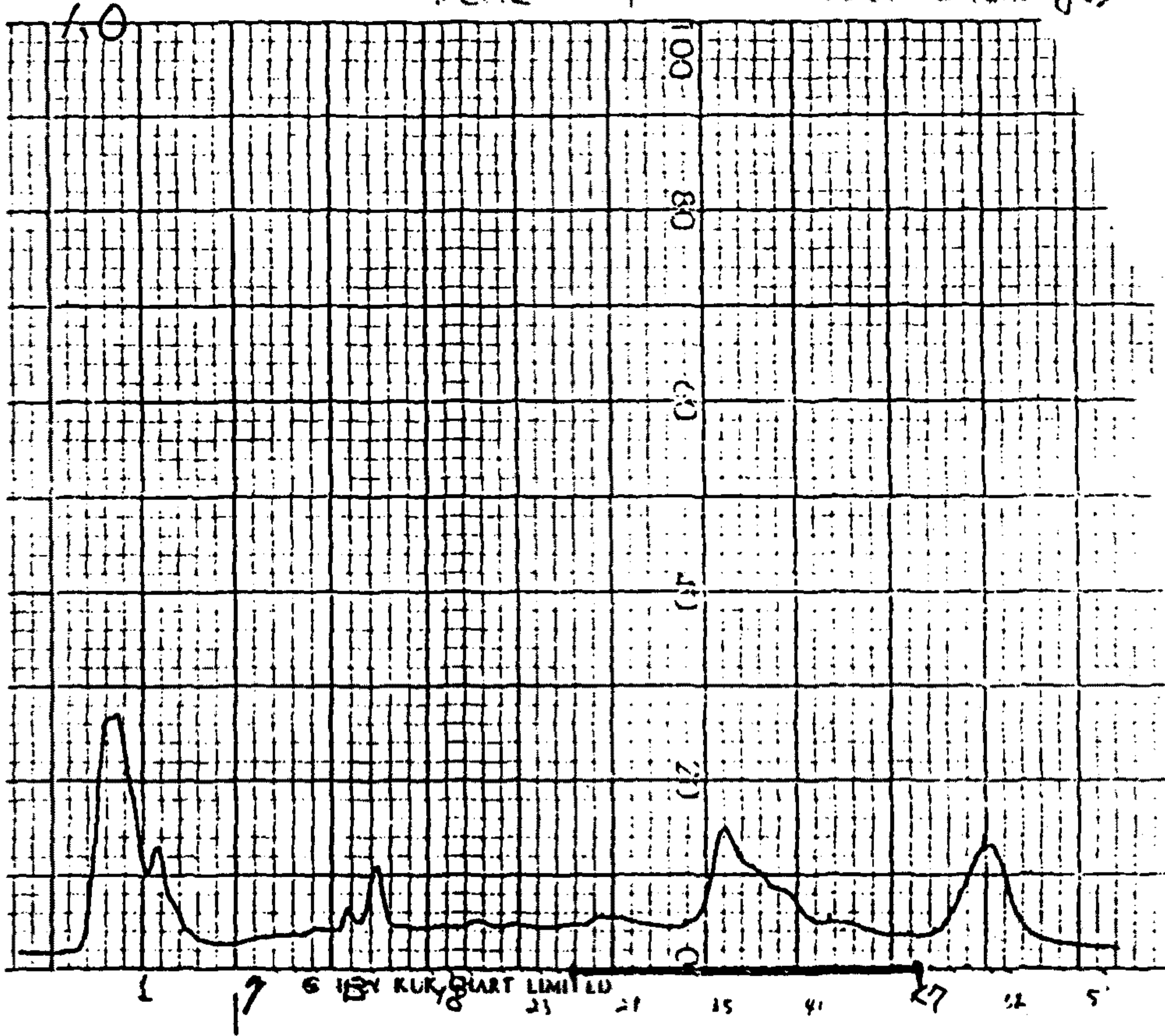


그림 2. DEAE-Sepharose Chromatography 결과

Crude extract를 2x20 cm DEAE-Sepharose column에 developing한 결과로 thrombin inhibiting fraction은 protein profile 아래 bar로 표시하였다

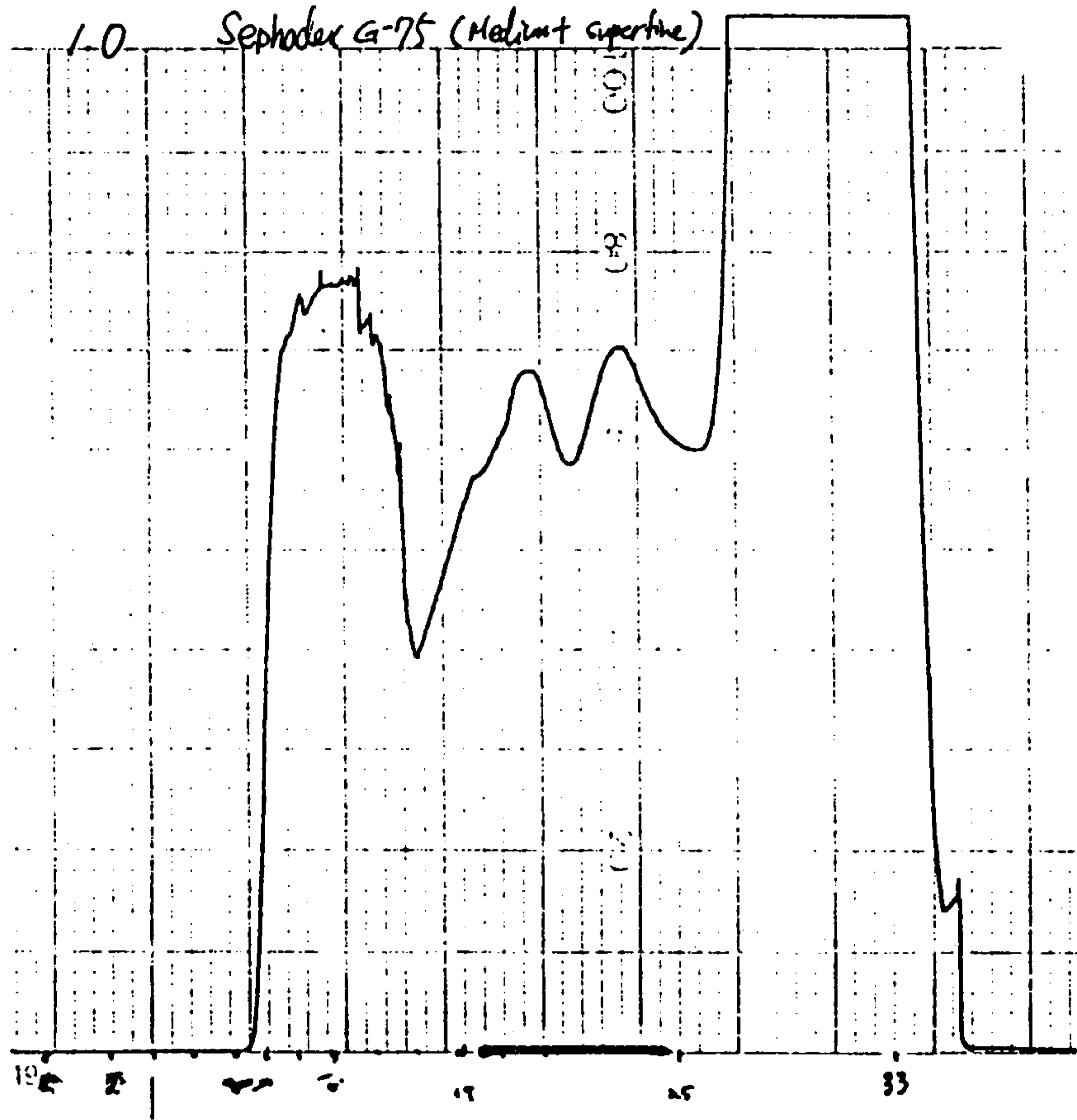


그림 3. Gel Filtration 결과

Anion exchange chromatography 이후 Sephadex G-75로 gel filtration 한 결과를 나타낸 그림으로 역시 active 한 분획들을 아래 bar로 표시하였다

packing 하였다. 이 column을 0.1 M Tris pH 8.0으로 미리 equilibrate 시키고 여기에 5 ml의 시료를 loading 한 후에 같은 buffer에 0.5 M NaCl이 첨가된 buffer로 O.D._{254nm} 가 0.05 이하가 될 때까지 씻어주었다. 그 후에 0.1 M glycine-HCl (pH 2.75)로 step elution 하여 3-4 column volume의 부피로 용출 하여 모두 13 ml을 모았다. (그림 4) 이 재료를 Speed-Vac으로 농축하고 Sephadex G-25 column으로 desalting 하였다.

(5) High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

지금까지 모아온 sample을 C₁₈ reverse phase column이 장착된 HPLC에 loading 하고 0-6% acetonitrile/0.1% TFA의 gradient로 110분간 분리하였다. (그림 5) 각 분획의 활성도를 조사해 보면 retention time으로는 30분에서 65분 까 지나온 모든 분획에서 활성도를 나타내었고, acetonitrile의 농도로 보면 21%로부터 이내에 활성 단백질이 모두 용출되었다. 적어도 3개의 peak에서 activity를 보여 각각에 대한 분석이 필요할 것 같다. 또한 한 종류의 단백질이 HPLC profile에서 너무 넓게 퍼져 나오는 경향을 보이고 있는데 이것 또한 해결해야 할 문제로 남아있다.

(6) SDS Tricine PAGE

앞에서 분리하는 과정마다 active 한 분획들을 모아 16% T, 3% SDS-Tricine PAGE를 한 결과 그림 6과 같은 결과를 얻었다. 이 결과 마지막 step인 HPLC step에서 순수한 10 kda의 thrombin inhibitor가 분리 됨을 알 수 있었다.

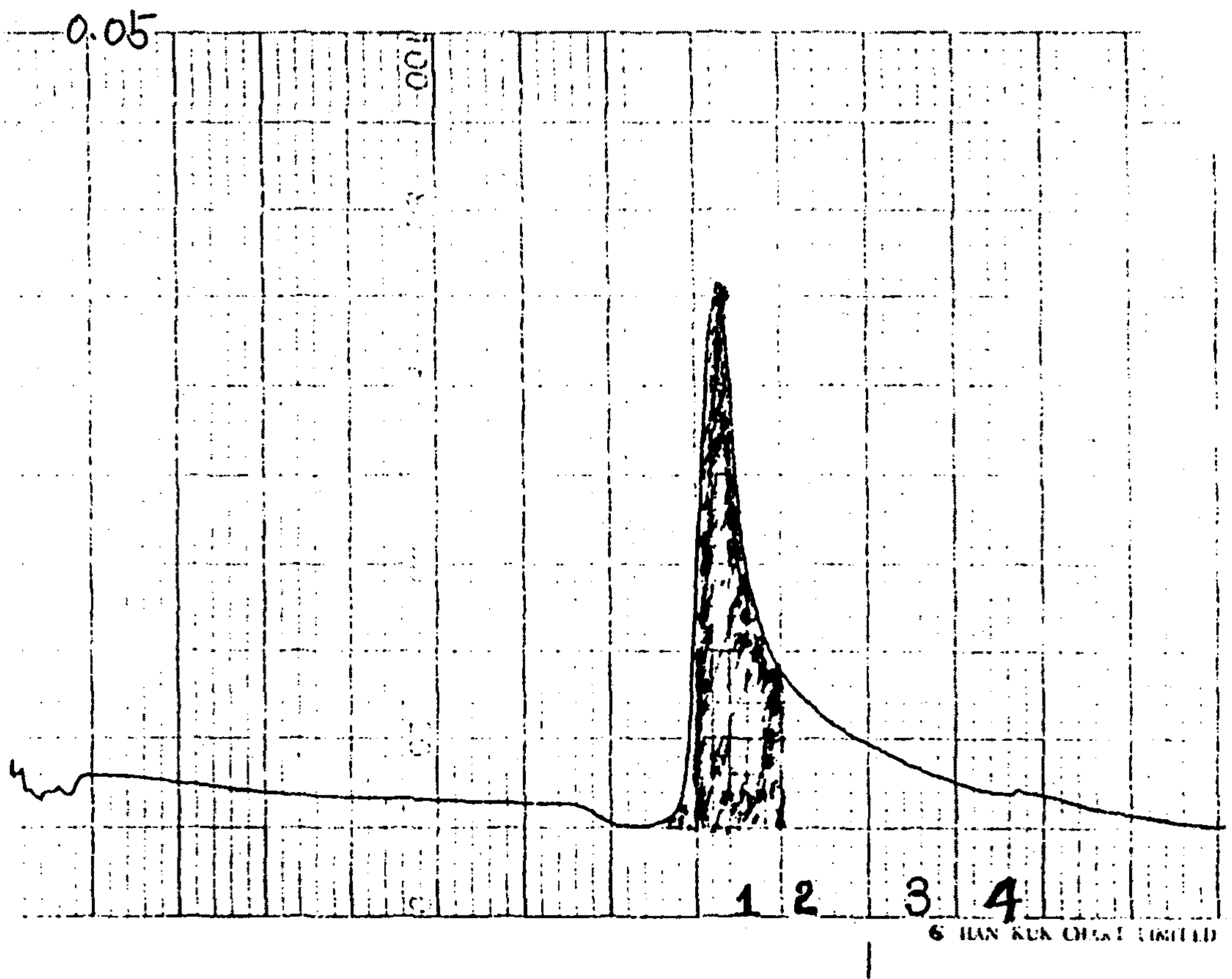


그림 4. Affinity Chromatography 결과

Thrombin-Sepharose로 gel filtration 에서 얻은 sample을 affinity chromatography 한 그림. active 한 분획들을 아래 bar로 표시하였다

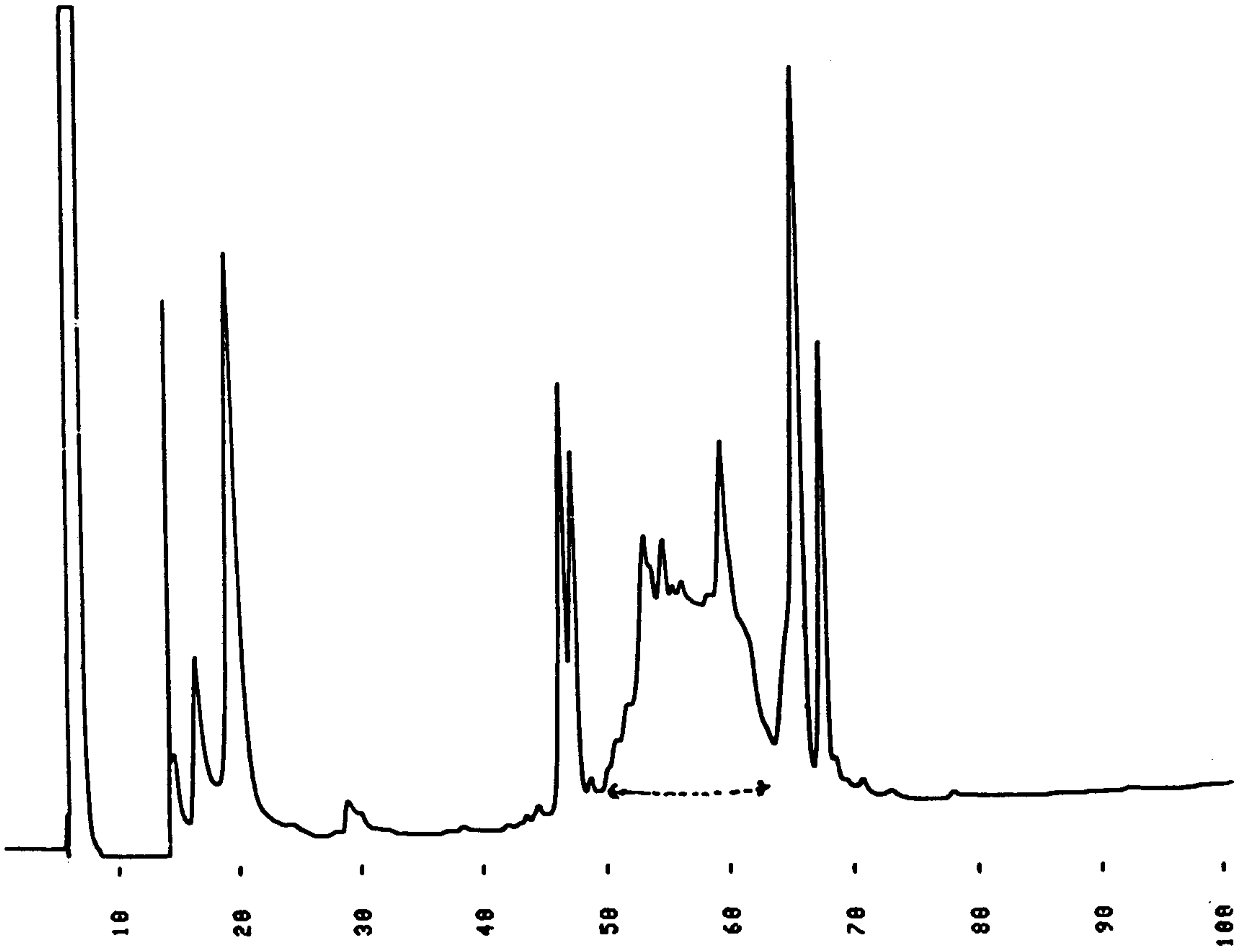


그림 5. Reverse phase HPLC 결과

C18 reverse phase column으로 앞에서 모은 sample을 분리하였다.

Active 한 부분이 넓게 퍼진 상태로 elution 되었다.

Band
SM 1 2 3 4

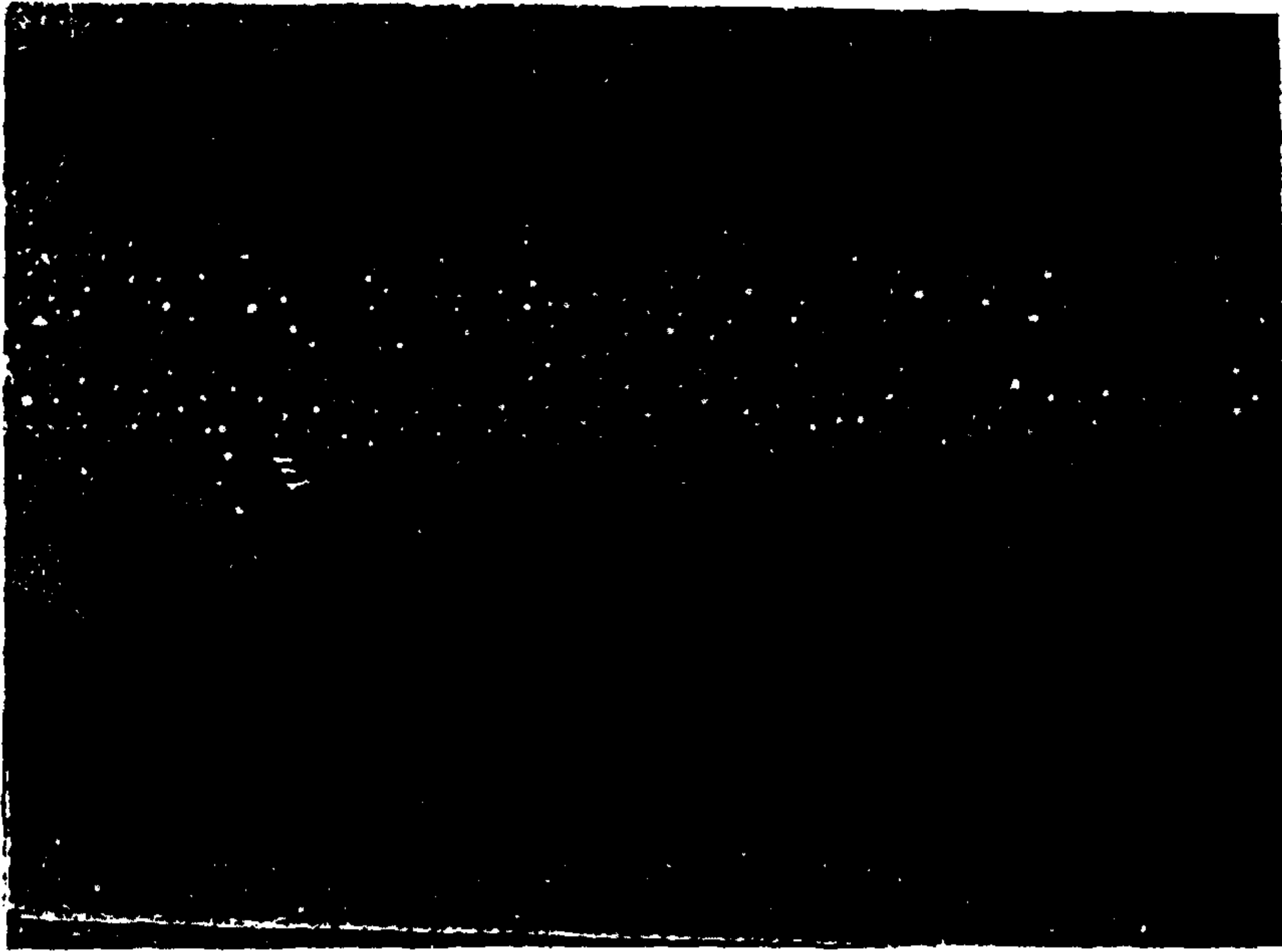


그림 6. SDS Tricine PAGE

SM : size marker (16.9kDa, 14.4kDa, 10.6kDa, 8.2kDa, 6.2kDa, 3.5kDa, 2.5kDa), 1번 : DEAE-Sepharose 분획, 2번 : Gel filtration 분획, 3번 : Affinity chromatography 분획, 4번 : HPLC 분획

Table. Purification Step 에 따른 specific activity

Step	Inhibitor Activity (ATU/ml)	Protein 농도 (mg/ml)	Specific Activity	Total Protein 양	Yield (%)
Anion Exchange	155	0.84	184.5	168	100
Gel Filtration	1489.2	0.64	2326.9	13	97
Affinity Chromatography	21.87	0.012	1822.5	0.51	3

(7) N-terminus sequencing 결과

Automated Edman degradation 방법으로 thrombin inhibitor의 N-terminus를 알아보았을 때, 정상적인 amino acid를 밝혀낼 수 없었고, N-terminal block을 예상하여 20% TFA로 N-terminus를 deblock 하는 방법을 사용한 경우 DVPQP의 5개 아미노산 서열이 확인되었고 시료의 양이 적어 더 이상의 sequence는 확인할 수 없었다. TFA method의 경우 internal sequence 상의 Ser, Thr 등 산에 약한 아미노산서열부분이 끊기는 경우가 가끔씩 나타나 기도 하므로 internal sequence일 가능성도 있다.

(8) MALDI Mass Spec.

기초과학지원센터에 의뢰하여 단백질의 질량을 정량분석한 결과 다음과 같이 두 개의 결과를 얻을 수 있었다. 그림 7에서는 MW 6300 정도의 단백질을 확인하였고, 그림 8에서 보여지는 바와 같이 MW 7000 / MW 7400의 질량을 갖는 단백질을 확인할 수 있었다. 이 결과는 분리된 단백질이 한가지종류가 아

ratos Kompact MALDI 2 V4.0.0: + Linear High Power: 125 Peak 1 (26.26)

.Int. 100% = 2 mV [sum= 82 mV] Shots 1-30 Smooth Av 50

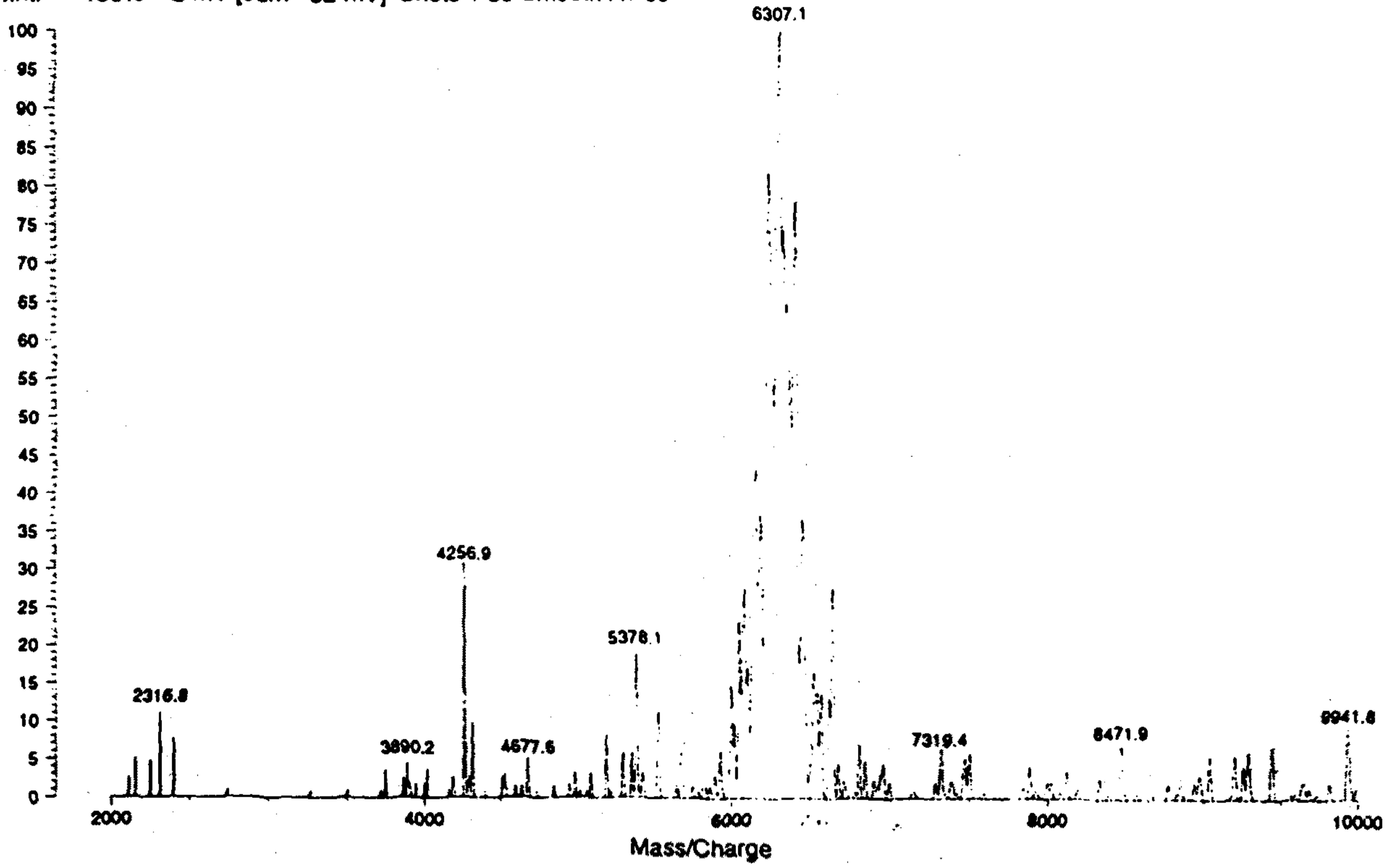


그림 7. Mass Spec. 결과 1

MALDI Mass Spec. 으로 HPLC 활성분획중 전반부 용출 분획을 분석한 결과

ta: Shong30002.6 22 May 95 16:52 Cal: Sincy2 13 Feb 95 19:47 Peak 3 (of 11--)

atos Kompact MALDI 2 V4.0.0: + Linear High Power: 125

nt. 100% = 4 mV [sum= 120 mV] Shots 1-30 Smooth Av 50

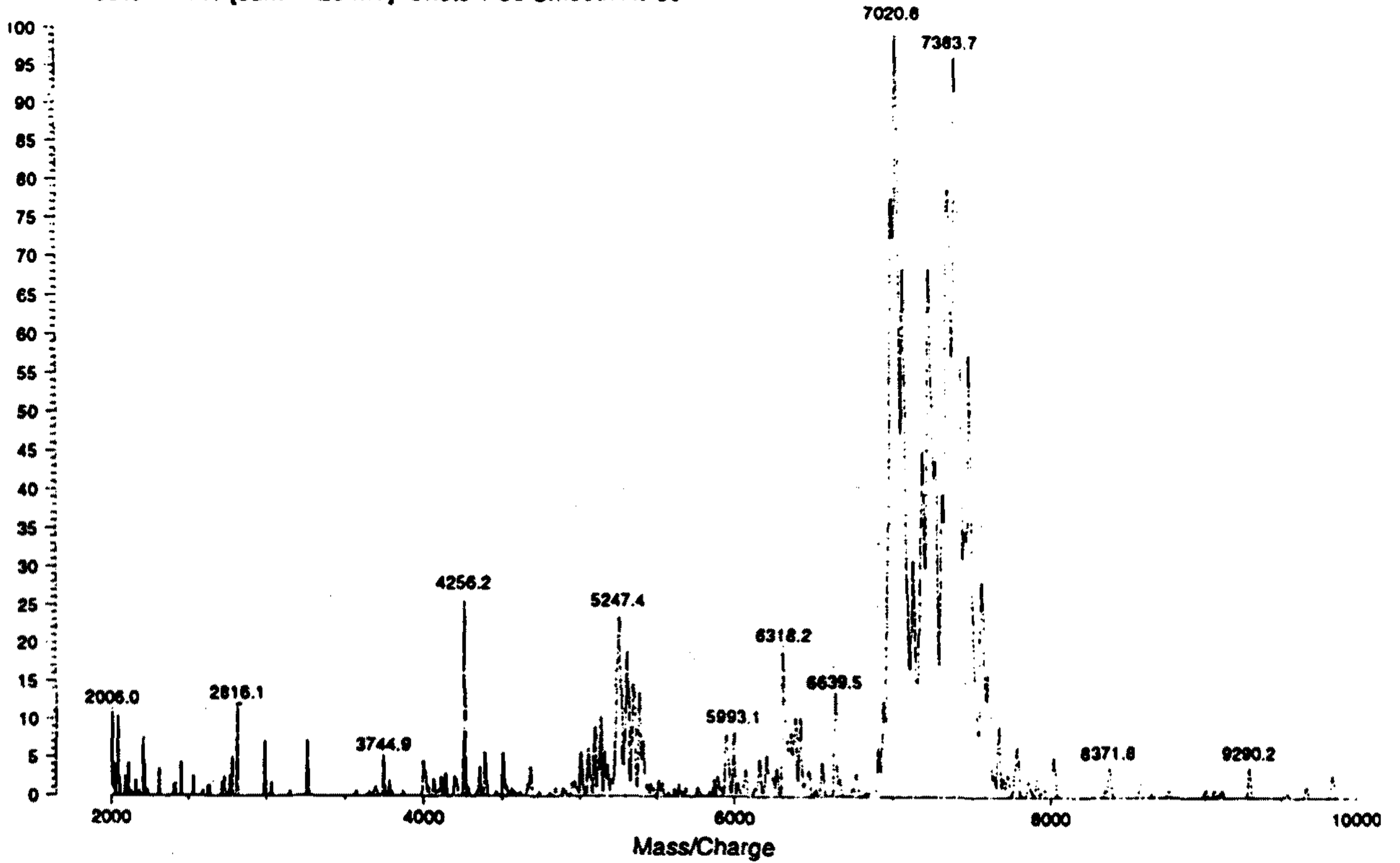


그림 8. Mass Spec. 결과 2

MALDI Mass Spec. 으로 HPLC 활성분획중 후반부 용출 분획을 분석한 결과

니고 다양한 subtype을 갖고 있다는 것을 보여주면, Mass Spec. 결과로 볼 때, glycosylation 되었을 가능성이 높은 것으로 사료된다.

2. 결론

가. 혈액응고억제물질을 우리나라 거머리에서 새롭게 개발이 가능하다.

나. 아미노산 서열을 조금 더 밝혀낸다면, Gene cloning을 통한 대량생산이 가능 할 것으로 보인다. 대량생산이 가능해지면 의약개발을 위한 테스트를 수행하여 임상에서의 응용가능성을 찾아낼 수 있다.

다. 조금더 효율적인 분리정제 방법으로 항트롬빈 단백질 같은 의약분야에 응용이 가능한 bioactive peptide를 분리할 수가 있으며, 질환 치료에 이용되는 여러 신의약 개발을 가능하게 할 수 있다.

제 3 장 Cre/lox site specific recombination을

이용한 염색체 DNA의 절단 및 표지에 관한 연구

제 1 절 서설

큰 genome을 분석하려면, 먼저 gene들의 상대적 위치를 파악하기 위한 physical mapping이 필요하다. 이를 위하여 genome 상에 unique한 cleavage site를 이용하여 DNA를 작은 수의 절편으로 자른 다음 원하는 절편을 인식하여 분리해내는 것이 필요하다. DNA를 절단할 때 주로 이용되는 제한효소는 그 인식부위의 크기가 보통 4-6 bb로서 길이가 긴 염색체 DNA를 절단하면 너무 많은 수의 절편을 생산하므로 유용하지 못하다. 이에 염색체 DNA를 절단하는 많은 방법들이 그동안 고안되어 왔다. 흔히 이용되는 방법으로 8 bb의 비교적 긴 인식부위를 갖는 제한효소들을 사용하는 방법이 있다. 그러나, 이 방법을 쓸 경우에도, 여전히 많은 수의 절편으로 나누어지기 때문에 DNA 절편의 상대적 위치를 파악하는데 어려움이 있다.

길이가 긴 절편들을 생산하는 또다른 방법으로, 제한효소의 인식부위를 변화시켜서 특이성을 바꾸는 방법이 있다. 이것은 미리 정해진 절단위치를 DNA binding molecules를 이용하여 보호한 다음, 같은 인식부위를 갖는 methylase를 methylation시켜서 DNA binding molecule을 제거한 후 보호된 부분만이 효소에 의해 인지되어 잘리도록 하는 방법이다. 그러나, 기존의 어떤 방법을 쓰더라도, 일단 절단된 DNA 절편에서 원하는 절편을 인지하여 분리해내려면 여러 단계의 실험을 거쳐야 한다. 즉, 분리된 DNA 절편을 인지하기 위해서는 labeling된 probe를 만들어 Southern hybridization 등의 방법이 필요하다. 위와

같은 문제점을 극복함과 동시에 더 큰 크기의 DNA 절편을 만들어 낼 수 있는 방법으로, 본 연구에서는 site-specific recombination을 이용하는 방법을 개발하고자 하였다.

Site-specific recombination의 경우, recombinase가 인식하는 특정 부위의 크기가 커서 염색체 상에서 매우 드물게 나타나기 때문에, 이러한 recombinase를 제한효소처럼 이용하면, 기존의 방법보다 더 간편하고 효율적으로 길이가 긴 DNA 절편을 생산할 수 있다. 즉, 특정 recombinase의 인지부위를 염색체 상의 원하는 위치에 삽입한 다음, 인지부위를 포함하는 oligonucleotide와 recombinase를 함께 넣어주어 반응시키면 염색체와 넣어준 oligonucleotide 사이에서 site-specific recombination이 일어나서, 큰 염색체가 특정위치에서 잘리는 것과 같은 결과를 얻게 된다. 뿐만 아니라, 기존의 절단 방법으로 하면, 잘려진 DNA 절편에서 원하는 특정 DNA 절편을 가려내기가 쉽지 않은데 비해서, 본 연구에서 개발하고자 하는 방법을 이용하면, 미리 labeling된 oligonucleotide를 넣어줌으로써 염색체 DNA가 특정위치에서 잘려짐과 동시에 그 끝이 표지되게 되어, 쉽게 detection할 수 있다.

본 연구에서는 *loxP*의 인지부위를 갖는 *cre recombinase*를 이용하여 yeast 염색체 DNA를 절단해 보고 또한, 절단할 때 labeling된 oligonucleotide를 이용함으로써 절단된 절편이 동시에 labeling되어 detection되도록 하고자 하였다.

제 2 절 연구 결과

1. *loxP*를 포함하는 yeast integration plasmid의 제조

두 개의 *loxP* 부위가 포함되어 있는 pRH43에서 *Bam*HI과 *Xho*I의

cohesive end를 가진 *loxP*(596bp DNA fragment)를 분리해 내어서 *Ura3* 유전자를 가지고 있는 yeast - *E. coli* shuttle vector인 pRS306의 multiple cloning site 의 *Bam*HI과 *Xho*I에 삽입하였다. 제조된 pRS306를 pMS32라 명명하였다. (Figure 1, 2).

2. Chromosome 상에 *loxP* sequence를 갖는 yeast strain의 제조

pMS32 plasmid를 restriction enzyme인 *Eco*RV로 digestion하여 linearization시킨 후, *S. cerevisiae*에 LiCl 방법을 이용하여 transformation 시켜서 yeast 염색체의 *Ura3* 유전자위치에 homologous recombination에 의해 삽입 되도록 하였다. 그런 후, Ura deficient plate에서 transformation 된 균주를 agarose microbead에 포집하는 방법으로 균주의 염색체를 분리해 내었다. Agarose microbead에 포집된 chromosome을 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 통하여 fractionation 한 후, Southern hybridization 방법을 이용하여 *loxP* sequence의 chromosomal integration을 확인하였다. (Figure 3)

3. 염색체 DNA와 *loxP* oligonucleotides를 이용한 site-specific recombination reaction

loxP sequence를 yeast integration plasmid에 cloning 하여 *Saccharomyces cerevisiae* 염색체의 특정위치에 homologous recombination에 의하여 삽입한 다음, 염색체를 분리해내고 *loxP* 부위를 포함하는 oligonucleotide와 Cre protein을 넣어 *in vitro* Cre/*lox* recombination 반응을 일으켰다. 그 다음, PFGE를 수행하여 염색체가 선택적으로 절단되었는지를 확인하였다. 또한, ³²P 또는 biotin으로 labeling 한 oligonucleotide를 사용하여 recombination 반응을 일으킴으로써 절단된 DNA의 끝이 labeling이 되는지를 확인하였다. (Figure 4)

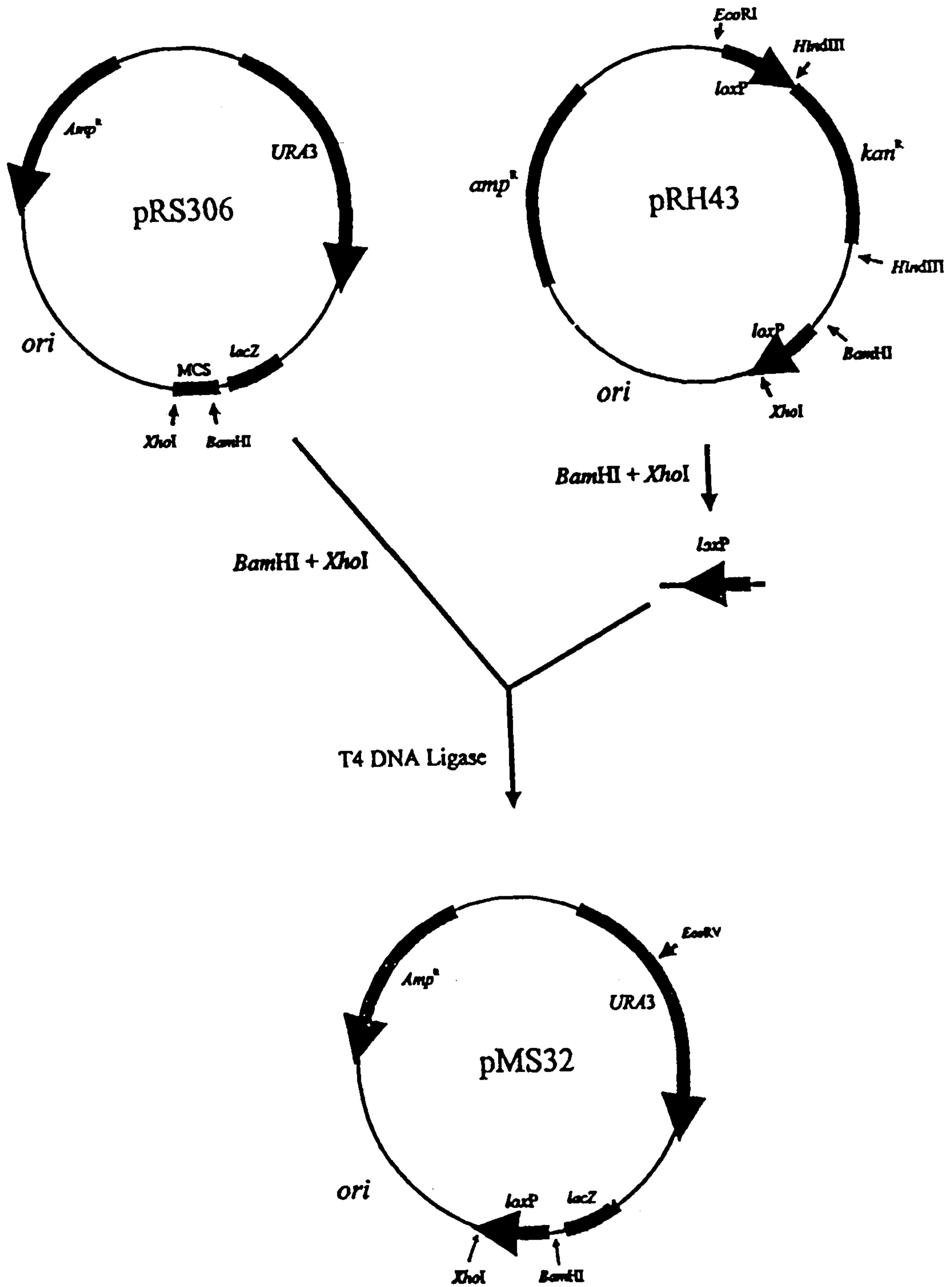


Figure 1. Construction of the recombinant plasmid pMS32

The pMS32, which can replicate in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, contains *Ura3* gene and one *loxP* site.

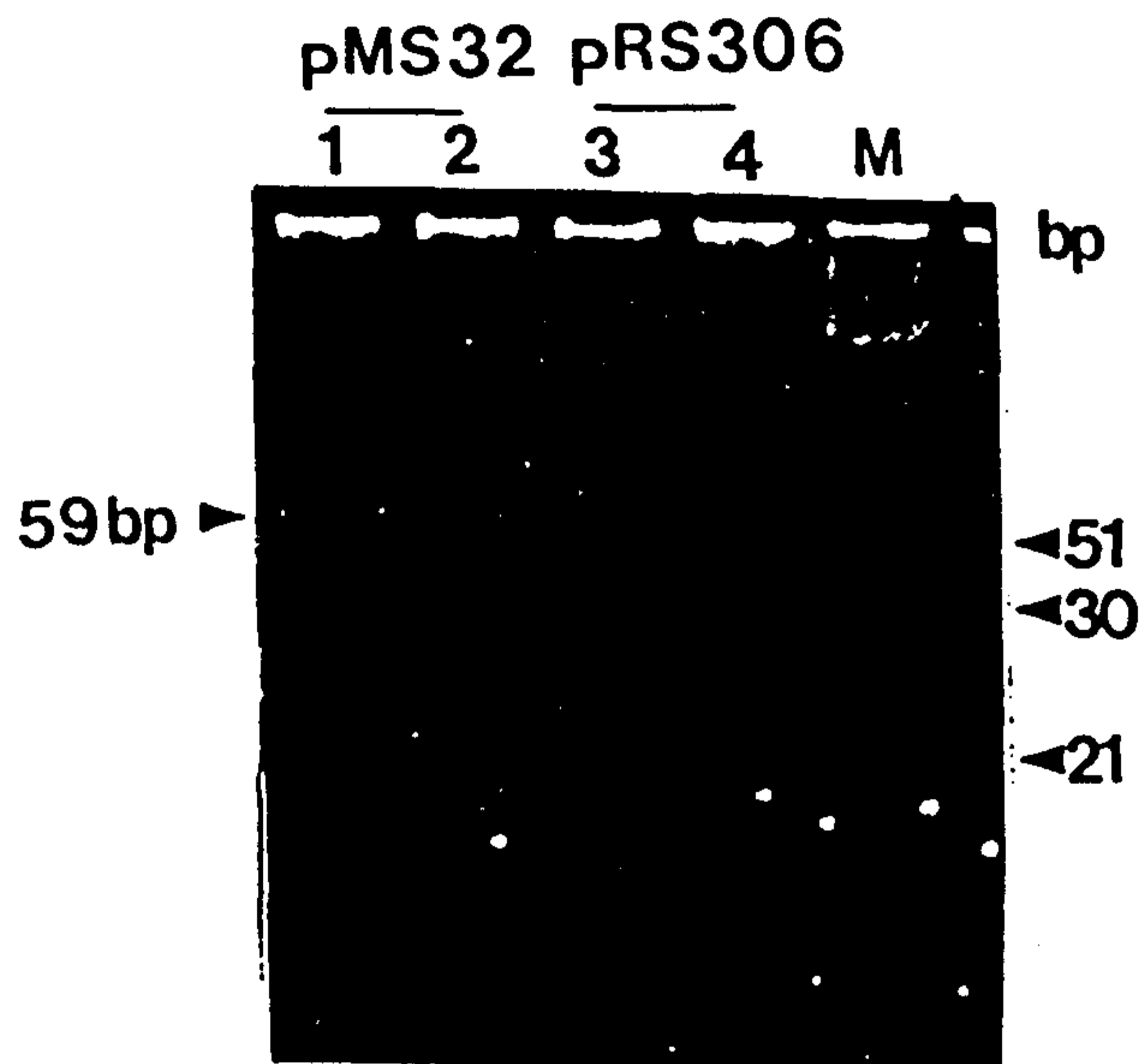


Figure 2. Restriction pattern of the recombinant plasmid pMS32

Plasmids pMS32 and pRS306 were digested with *Bam*HI, *Xho*I, and *Eco*RI and analyzed on 20% polyacrylamide gel. Lanes 1 and 3 were digested with *Bam*HI and *Xho*I. Lanes 2 and 4 were digested with *Bam*HI, *Xho*I and *Eco*RI. M is size maker, *Hae*III-digested λ DNA. 59 bp-*loxP* fragments were shown in pMS32.

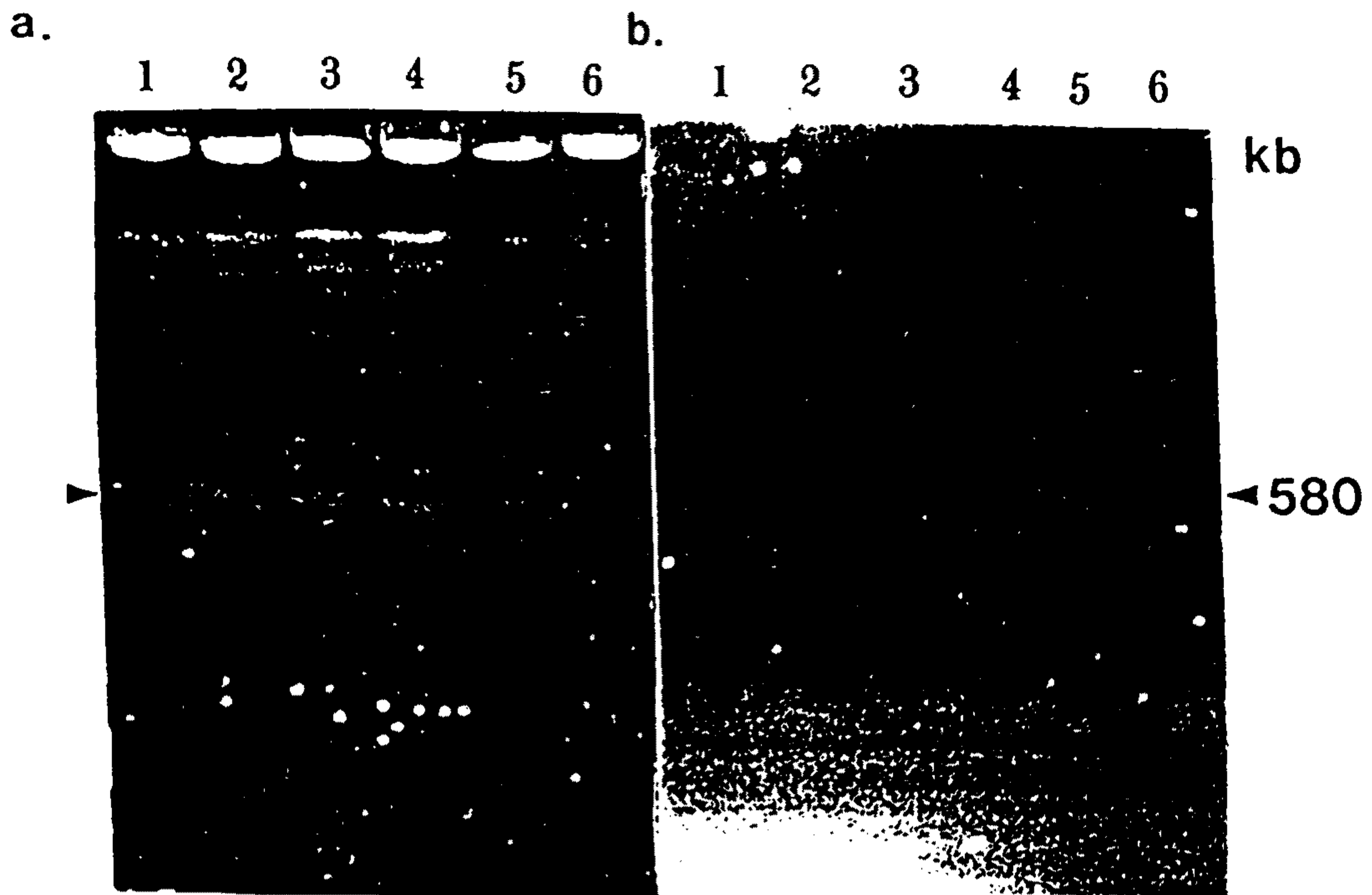


Figure 3. Analysis of yeast chromosomal DNA by PFGE and Southern hybridization

A) PFGE of yeast chromosomal DNA. Intact chromosomes prepared in agarose microbeads were analyzed by PFGE(150V, 1% agarose, 1min switch time for 23hr). Lanes 1 and 2 are control strain (*S. cerevisiae* SHY3, *Ura*⁻). Lanes 3, 4, 5 and 6 are selected transformants #1, 7, 9 and 13.

B) Confirmation of insertion of *loxP* site in chromosome V(580kb) by Southern hybridization. Probe used in this experiment was ³²P-labeled *loxP*.

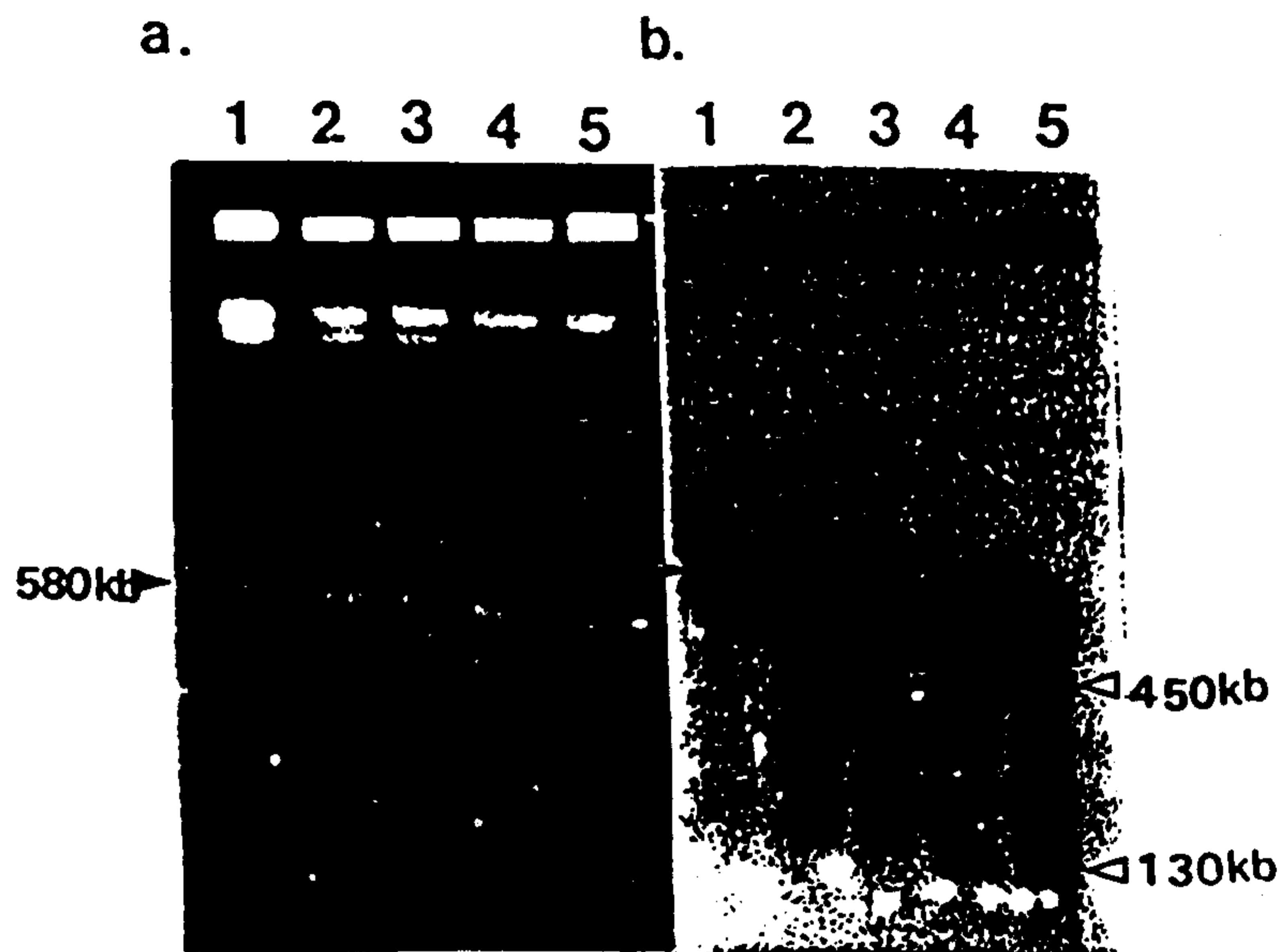


Figure 4. Site-specific recombination reaction between chromosomal DNA and oligo *loxP*. After Cre recombination reaction between chromosomal DNA and oligo *loxP*, reacted chromosomes were analyzed by PFGE(150V, 1% agarose, 1min switch time for 23hr)(A). Lane 1, control(no Cre); lane 2, control(no oligo); lanes 3, 4 and 5, molar ratios of chromosome to oligo, 1:10, 1:100 and 1:200, respectively.

Chromosome V and cleaved DNA fragments are indicated as arrows in Southern hybridization(B). Probe used in this experiment was ^{32}P -labeled *loxP*.

4. Plasmid DNA 와 biotin-labeled oligonucleotides를 이용한 site-specific recombination reaction

또한, Cre/lox site-specific recombination 반응에 이용되는 oligonucleotide 를 terminal deoxynucleotidyl transferase를 매개로 하여 biotin-dUTP로 end-labeling한 후, recombination 반응에 이용하였다. 반응 후, streptavidin-alkaline phosphatase로 발색반응을 일으켜서 절단된 plasmid fragment를 확인하였다. (Figure 5)

제 3 절 고찰

본 연구에서는 Cre/lox site-specific recombination system을 이용하여 yeast 염색체 DNA의 선택적인 절단 및 표지방법을 고찰하였다. 본 방법은 길이가 긴 염색체를 평균 크기가 큰 소수의 절편으로 절단하므로 각 유전자의 위치를 쉽게 알아낼 수 있을 뿐만 아니라 절단과 동시에 표지까지 할 수 있으므로 염색체 DNA의 physical mapping에 필요한 시간과 절차를 크게 줄일 수 있다. 따라서, 인체 유전자처럼 그 크기가 매우 큰 염색체에 이 방법을 응용할 경우, 손 쉽게 physical mapping을 할 수 있으며 염색체에서 원하는 부분만을 분리하여 DNA를 분석 및 염기서열결정에 크게 기여하리라 기대된다.

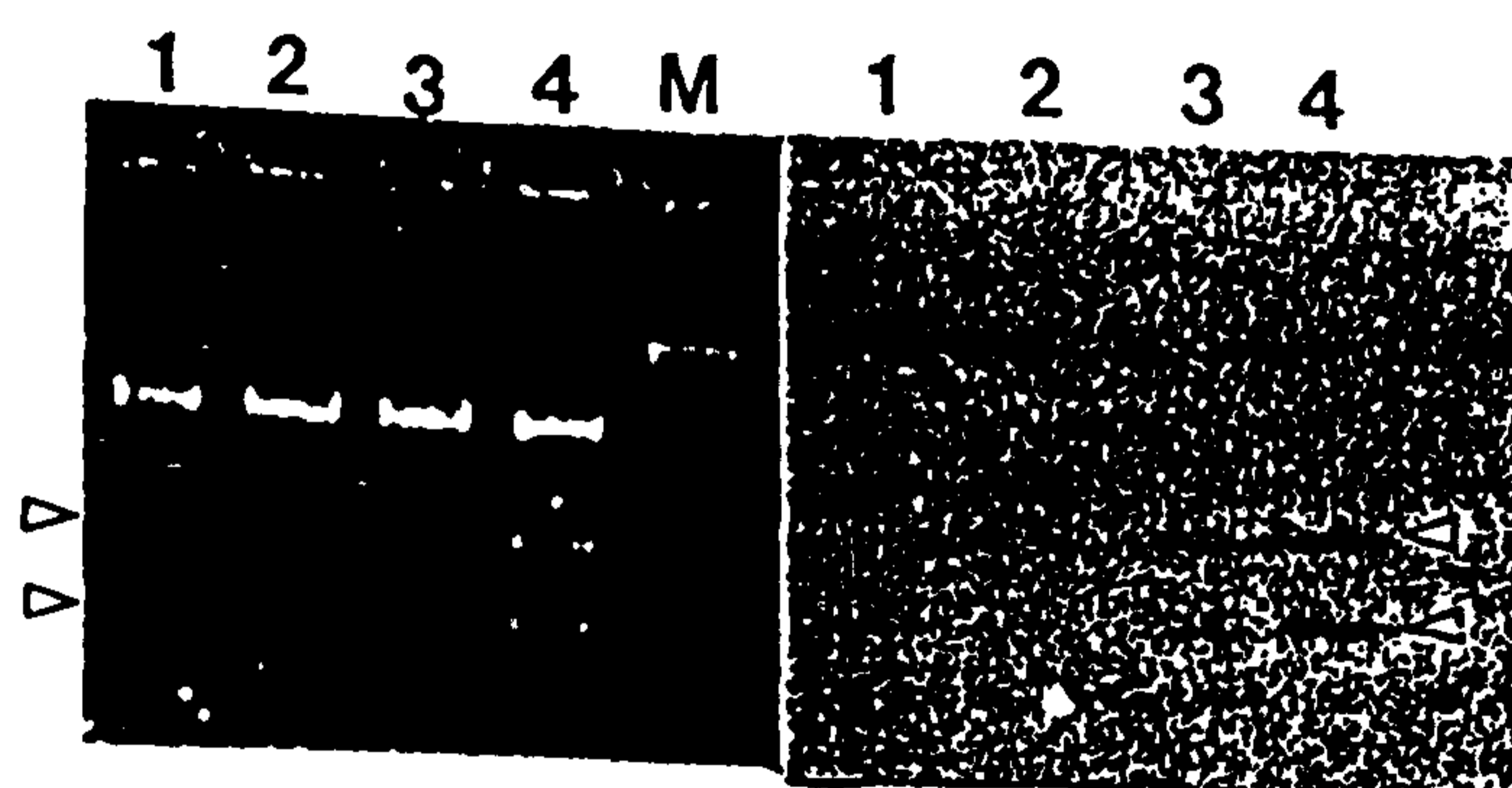


Figure 5. Site-specific recombination reaction between plasmid DNA and biotin-labelled oligo and its detection of reaction product

A) Agarose gel electrophoresis. Reaction substrates were 100 ng of linearized pMS32 plasmid DNA and biotin-labelled oligo. Lane 1, control(no Cre); lanes 2, 3 and 4, molar ratio of pMS32 and oligo are 1:1, 1:2, 1:5, respectively. M is size maker.

B) Detection of reaction product using streptavidin-AP.

제 4 장 Retroviral vector의 고농도 생산

제 1 절 서설

유전자 치료 (gene therapy)란 primary human cell에 새로운 유전자를 도입함으로써, 확인된 유전적 결함을 치료하거나, 체내에서 어떤 질병을 치료하기 위한 유용한 물질을 생산하기 위한 것이다. 유전자 치료는 전통적인 생화학적 약물치료에 비해서 다음과 같은 장점이 있어 유전자 치료의 임상실험이 계속적으로 증가하고 있다.

- 첫째, 삽입된 유전자는 유전자 치료이외의 방법으로는 절달하기가 아주 어려운 DNA, RNA, 단백질과 같은 아주 복잡한 분자들을 생산한다.
- 둘째, 원하는 유전자를 특정한 target cell에 삽입함으로써 특정 tissue에 작용하는 gene product의 생산을 조절할 수 있다. 원칙적으로 유전자 치료는 유전자가 target cell과 그의 progeny에서 계속적으로 가능하기 때문에, 영구적인 치료 방법이다.

성공적인 유전자 치료를 위해서는 다음의 몇가지 문제점들이 선결되어야 한다.

- 첫째, 원하는 치료용 유전자를 target cell에 넣어 줄 수 있어야 한다.
- 둘째, 전달된 유전자가 target cell에서 발현되어 적정 수준의 gene product를 생산할 수 있어야 한다.
- 셋째, 치료 기능을 가진 DNA, RNA, 혹은 단백질이 target cell에서 올바르게 생산되어 기능을 나타내야 한다.

Adenoviral vector나 liposome등을 이용한 다양한 유전자 전달 방식이 연구되고 있으나, 현재까지 유전자 치료에 가장 널리 사용되는 유전자 전달방법은

복제가 안되는 retroviral vector를 이용하는 것이다. Recipient cell을 궁극적으로 lysis하는 대부분의 virus와는 달리 retrovirus는 숙주세포에 감염된 후 숙주세포의 chromosome에 proviruses 형태로 integration 된다. 일반적으로 vector의 structural gene을 치료 유전자로 대체시킨다. Retroviral vector 방식을 이용한 유전자 치료의 예로는 각종 암, adenosine deaminase deficiency, cystic fibrosis, familial hypercholesterolemia와 같은 유전병, AIDS와 같은 전염병이 있다. 현재 retroviral vector를 이용한 유전자 치료는 FDA의 승인을 받아 임상 실험이나 phase I 이나 phase II 단계에 있다. Retroviral vector를 이용한 유전자 치료를 받은 환자는 110명이 넘는데, 아직까지 retroviral vector로 인한 독성을 나타낸 환자는 보고되지 않았다.

Retroviral vector를 이용한 유전자 치료의 임상실험 증가하면서 고농도의 retroviral vector가 대량으로 필요하게 되었다. 그러나 retroviral vector 생산에 관한 연구는 미미한 형편이다. 대부분의 retroviral vector는 amphotropic retrovirus packaging line을 배양하여 생산한다. Target cell에 retroviral vector를 감염시키기 위해서는 retroviral vector의 농도가 높아야 하나, retroviral vector의 역가의 반감기가 37°C에서 5-7시간밖에 안되고 상당히 외부 조건에 민감하기 때문에 고농도 대량생산 또는 농축에 어려움이 있다고 알려져 있다. 국내에서도 유전자 치료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 임상실험에 필요한 고농도의 retroviral vector의 대량생산에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 CV-1과 NIH 3T3 cell을 target cell로 선정하여, target cell의 성장을 측정하고, 최적 seeding density 및 최적 감염 시간을 결정하였다. 또한, cell type이 retroviral titer 측정에 미치는 영향을 연구하였고, 희분식 배양에서 생산되는 retroviral titer를 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세포주 및 배양 배지

Amphotropic producer cell line인 pMFG/ ϕ CRIP은 Michigan 대학의 Dr. James Wilson으로부터 분양 받았다. Packaging cell line 인 ϕ CRIP은 fibroblast NIH 3T3에서 유도된 것으로, 여기에는 두 개의 recombinant vector가 들어 있는데, pCRIPenv- 는 gag, pol 유전자를 갖고 있고, pCRIPAMgag- 는 4070A amphotropic virus genome을 갖고 있다. packaging cell line에 plasmid pMFG를 transduction하여 producer cell line을 만드는데, 이 plasmid에는 LTRs, packaging signal ϕ (psi) 와 LacZ가 들어 있다. LacZ 유전자는 bacterial β -galactosidase를 발현하므로 감염된 target cell을 염색하여 쉽게 확인할 수 있다.

세포배양 배지로는 Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM)에 10% calf serum supplemented (CCS)를 첨가하여 사용하였다.

NIH 3T3 와 CV-1 cell을 이용하여 virus supernatant를 적정하였다. 배양배지로는 DMEM에 10% calf serum supplemented를 첨가하여 사용하였다.

pMGF/ ϕ CRIP 과 CV-1 cells 모두 부착성 세포이므로 계대배양은 첫째, Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 Hank's Balanced Salt solution으로 씻고, trypsin-EDTA를 처리한 후, 10% serum DMEM을 넣어 중화시킴으로써 이루어 진다. 세포는 1:10의 비율로 나누어 배양하였다.

2. Target cell의 성장 측정

Target cell인 NIH 3T3 와 CV-1 cell을 6-well plates에 각각 1×10^5 cells/ml의 농도로 넣어 seed 한 후, 10% calf serum이 든 DMEM 배지 3 ml을 넣어 배양하였다. 초기 lag period를 알아보기 위하여 12시간 간격으로 2

회 세포성장을 측정했고, 이후에는 24시간 간격으로 측정하였다. 통계처리를 위하여 실험은 3회 반복하였다.

3. Virus의 적정

NIH 3T3 cell을 10^4 으로, CV-1 cell을 2×10^4 으로 six well plate의 각 well에 접종하여 3mL의 배양액을 넣고 retrovirus로 감염하기 전에 18-24시간 배양했다. 사용된 배양액을 제거한 후, 0.2 mL의 virus 용액과 1.8 mL의 polybrene 4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 포함된 배지를 함께 넣었다. 모든 virus 용액은 0.45 μm filter를 통과시켜, supernatant 중에 존재할 수 있는 free producer cell을 제거하여, target cell의 in site transfection을 방지했다. 37°C에서 12-17시간 지난 후 배양액을 3 mL 배지로 교환하여 target cell이 confluence하게 자라게 했다. Ca^{2+} , Mg^{2+} free Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)으로 두 번 washing 한 후, 0.5% (v/v) glutaraldehyde 용액 1.5 mL로 약 15분 동안 target cell을 fixing 시켰다. Cell을 HBSS로 다시 두 번 washing했다. Staining 용액은 20 mg/mL(2%) X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)을 취해 5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 mM MgCl_2 을 포함한 용액 1 mL의 용액을 넣은 후 37°C에서 1-12시간 incubate 했다. 푸른색으로 염색된 colony를 세어 colony-forming unit per milliliter (CFU/mL)로 나타냈다.

Target cell이 superinfection되는 경우, virus titer가 실제보다 적게 나타나므로, dosage response experiment를 실시하여 CFU 결과와 사용된 virus supernatant 양과의 비례관계를 확인했다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Target cell의 성장 측정

성공적인 유전자 치료를 위해서는 target cell이 retrovirus envelope에 존재하는 protein과 결합할 수 있는 receptor를 가지고 있어야 하고 또한, 세포가 왕성하게 분열하고 있는 동안에만 전달된 외래 유전자가 세포의 genome으로 도입되므로 대수 증식기에 retrovirus를 감염시켜야 한다.

NIH 3T3와 CV-1의 성장 곡선을 Fig. 1에 나타냈다. 초기 12시간 동안에는 두 세포 모두 lag period를 나타냈으나, 12시간 이후에는 완전히 대수 증식기에 도달했다. Specific growth rate (μ)는 NIH 3T3의 경우 1.13 day⁻¹, CV-1의 경우 0.48 day⁻¹이며, NIH 3T3의 성장이 빨랐다. 따라서, virus titer를 측정하는 조건으로 NIH 3T3 cell은 1 x 10⁵/mℓ로 seeding 한 후 24시간이 경과된 후 virus를 감염시키는 것이 좋고, CV-1의 경우는 2 x 10⁵/mℓ의 농도로 24시간 경과한 후 virus를 감염하는 것이 좋다고 판단되었다.

2. NIH 3T3와 CV-1 cell의 감염효율 비교

NIH 3T3와 CV-1 cell을 동시에 target으로 하였을때의 결과를 Fig. 2에 나타냈다. NIH 3T3 murine cells의 감염율은 CV-1 보다 약 300배 정도 높았다.

3. 희분식 배양에서 virus titer의 측정

Retrovirus titer는 packaging cell line 인 pMFG/φCRIP가 confluence에 도달한 후, fresh media로 교환해 준 뒤 24시간 후에 supernatant로부터 virus를 회수하여 NIH 3T3 cell에 감염시켰다. 그 결과 titer는 약 4 x 10⁴ CFU/mℓ로 다른 문헌의 보고 (보통 10⁵-10⁶ CFU/mℓ)보다 낮았다. (Fig 3) 현재 높은 titer 의 virus를 생산하는 virus clone의 선별과 안정화 작업을 진행중에 있다.

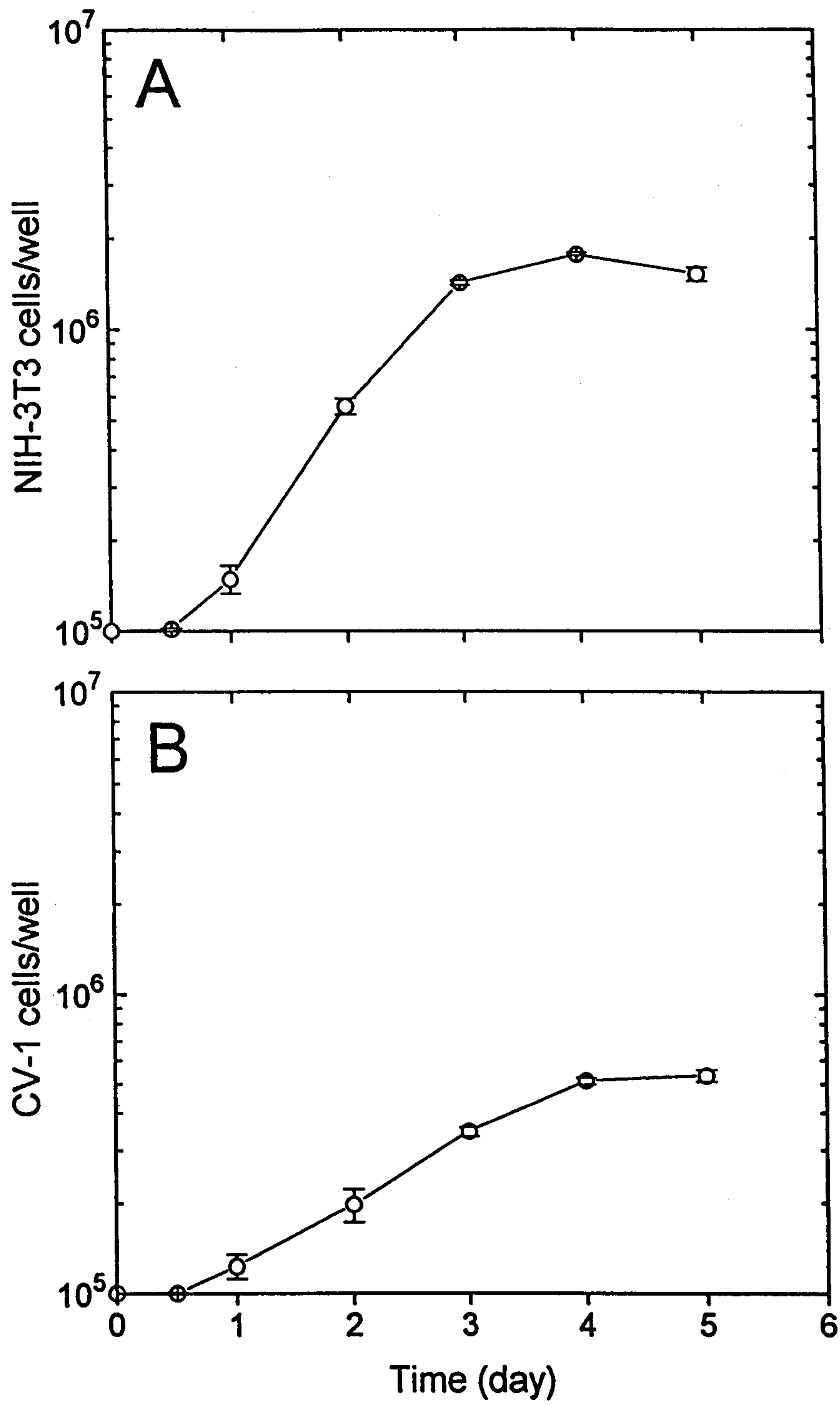


Fig 1. Growth curves of target cells (A) NIH 3T3 (B) CV-1

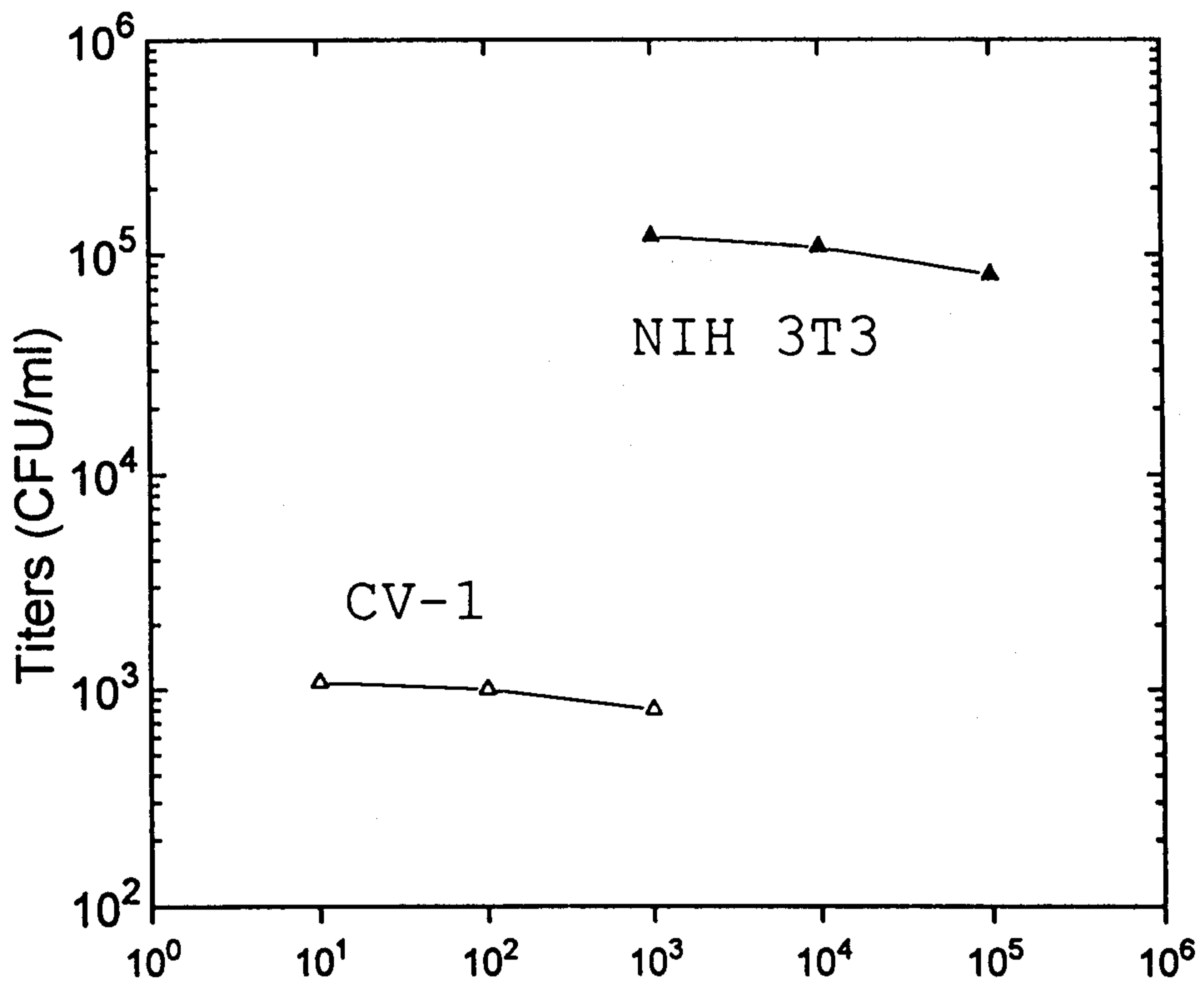


Fig 2. Comparison of CFU counts for NIH 3T3 and CV-1 cells

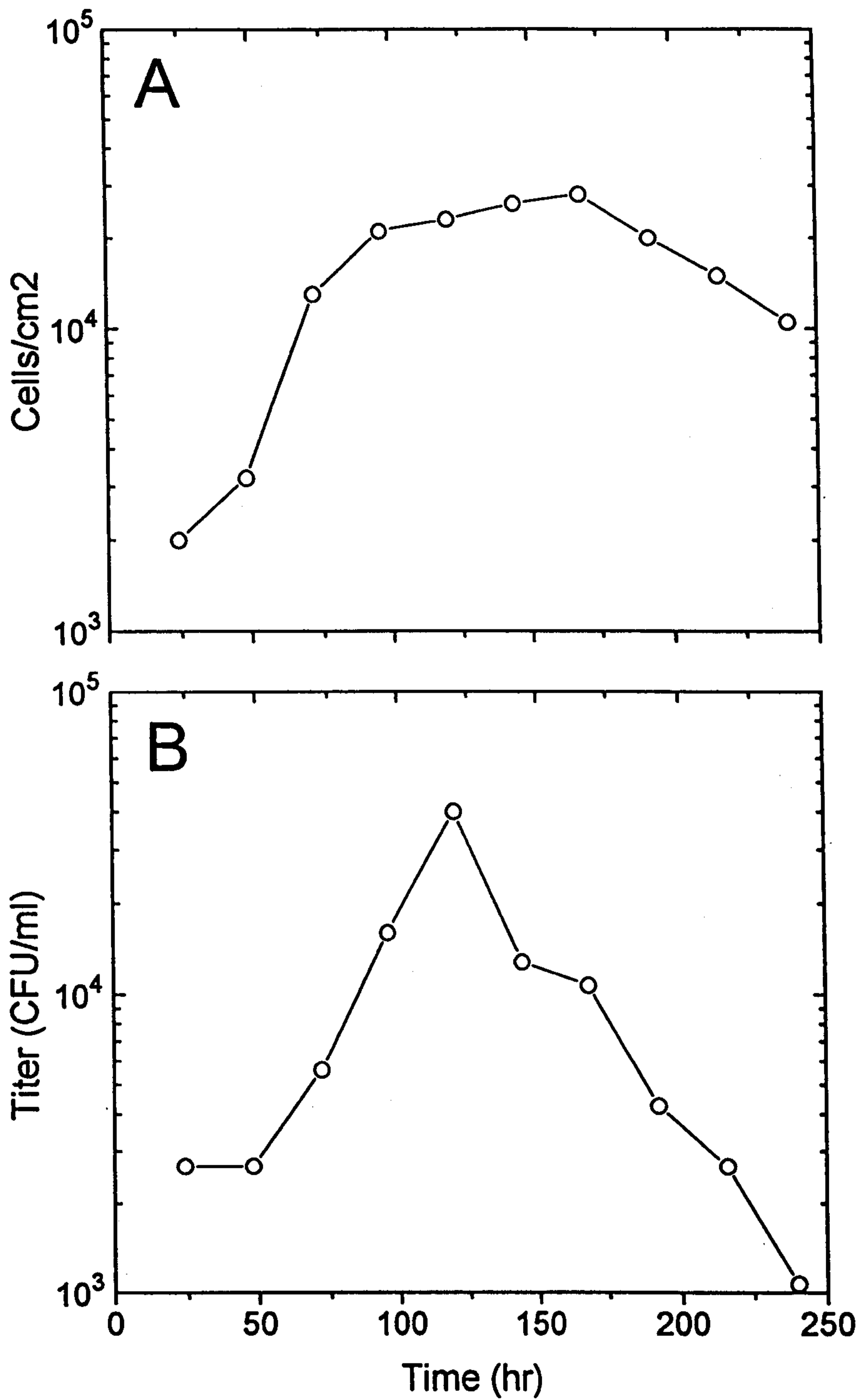


Fig 3. Batch cultures of pMFG/ ψ CRIP cells
 (A) Cell Numbers (B) Titers

제 5 장 단순포진 바이러스의 생체내 핵산대사 조절

제 1 절 서설

연구개발의 기술적 측면에서, 본 과제는 neurophillic하여 신경세포에 특
적으로 감염하는 Herpes simplex virus HSV를 신경 친화성 바이러스로 개발하
기 위하여, 생명 현상의 분자생물학적 연구의 주요 기술로 활용되고 있는 유전
자 재조합 기술을 응용하였다. 또한 신경세포내에서 유용한 유전자를 발현시키
는 기술을 개발하고 바이러스 질환의 진단과 치료 기술 개발에 유용한 핵산대
사과정, 생산적 감염, 잠복기감염, 신경세포내 감염을 억제하는 방법을 고안하고
항바이러스제의 screening에 응용하고자 한다.

경제.산업적 측면을 살펴보면 전 세계 인구의 약 70%가 HSV보균자이므
로 높은 시장성이 기대되며, 국내에서 활발히 연구개발 중인 항암제와 함께 항
바이러스제의 화학적, 생물학적 개발을 촉진하고 국제 경쟁력을 강화한다.

사회적 측면을 살펴보면 생활환경의 다양화와 복잡한 사회생활로 새로운
감염성 질환이 출현되고 감염 속도가 가속화되는 경향이며, 다양한 질환에의 노
출로 인한 복합적 질환의 생성에 보다 효과적인 치료방법이 요구된다.

지금까지의 연구개발 실적은 국외에서는 미국의 Priscilla A. Schaffer팀은
바이러스의 유전자 전사과정에 참여하는 ICP0, ICP4, ICP27의 전자촉진인자로
서의 기능과 조절기작에 대한 연구와 ICP0와 LATs이 latent infection과 virus
reaction에 미치는 역할에 대한 연구를 수행하고 있다. 미국의 Bernard
Roizman팀은 α -유전자의 발현을 조절하는 VP16과 ICP4와 바이러스 DNA 복
제에 대한 연구가 수행되고 있다. 미국의 David Knipe는 single strand DNA
binding protein 으로 알려진 ICP8과 바이러스 유전자 발현 유도과 발현 억제의

분리된 양쪽 기능을 갖는 ICP27과 DNA 합성에 필수적인 thymidine kinase 유전자와 latency에 관여하는 유전자 산물에 대한 연구를 수행하고 있다. 미국의 M. D. Challberg는 HSV DNA polymerase와 UL42의 상호작용 및 DNA polymerase 활성을 촉진시키는 UL42의 기능과 기작 등 바이러스 DNA replication에 대한 연구를 수행하고 있다. 영국의 P. O'Hare팀은 바이러스 전사인자와 숙주세포의 전사인자와의 상호작용 및 latency에 관여하는 LATs의 promoter에 관한 연구를 수행하고 있다. 세계 각 유명 제약회사에서 HSV 항바이러스제로서 단계별로 진행되는 바이러스 감염을 특징적으로 저해시키는 화합물질 뿐 아니라 바이러스 핵산대사 과정을 이해하여 DNA 합성과정에 영향을 미치는 핵산 유도체등이 개발 중이다.

국내에서는 HSV의 높은 감염성에도 불구하고 국내에서 HSV의 핵산대사에 관여하는 유전자의 기능을 연구하는 팀이 없다. 신경세포내 유전자 발현에 대한 연구도 거의 없어 초기단계에 불과하다. 국내 의약품 산업계에서 외국에서 개발한 몇가지 HSV 핵산 대사에 관여하는 바이러스의 증식을 막는 약품을 수입하는 실정이다. 국내에서 개발된 의약품을 screening 하는 과정에 필요한 HSV의 기초 연구가 전혀 진행되어 있지 않아 국제 경쟁력도 미약한 상태이다.

앞으로의 전망에 대해서 생각해 보면 HSV에 의한 질병은 국내에서도 많은 역학적인 문제를 일으키고 있으나 국내 연구 수준은 초보적인 단계이므로 바이러스 증식에 필수적인 유전자들의 기능에 대한 연구는 유전학적 특징의 이해 뿐만 아니라 바이러스의 생산적 감염을 방지하는데 중요한 기초 연구가 될 것이다. 또한 HSV가 임상적인 병원체로서 갖는 특이성은 인간에 감염되면 평생동안 바이러스 감염이 재발된다는 것이다. 따라서 HSV의 잠복기 감염과 감염 재발에 기여하는 바이러스의 유전자 기능에 대한 연구는 바이러스 감염의 진단, 잠복기 바이러스의 reactivation 억제, 질환을 치료하는데에 응용 될 것이다.

Herpes simplex virus (HSV) 1은 인간에 감염하는 herpes virus 중 가장 먼저 발견되고 많이 연구되어진 바이러스로 인간의 피부, 안구 그리고 중추 신경계 등에 감염하여 여러 다양한 질병을 일으킬 뿐만 아니라 잠복 감염의 상태를 유지하기 때문에 면역 상태가 저하하게 되면 재발하여 단순 포진을 일으킨다. HSV-1은 약 150 Kb의 선형 이중 가닥의 DNA genome을 가지며 약 80가지의 바이러스 단백질을 코딩하고 있다. 약 100-110 nm 직경의 정이십면체 capsid는 tegument라고 불리는 물질에 의하여 싸여져 있고, HSV-1 DNA는 toroid 형태로 capsid 안에 존재한다. Glycoprotein spiker를 가지는 겹겹질 (envelope)이 tegument 와 capsid를 싸고 있다.

HSV-1 숙주에 감염하기 위하여 우선 세포밖에 노출된 수용체에 결합한 후 바이러스의 겹겹질은 원형질막과 융합하게 된다. 세포내에 들어간 capsid는 nuclear pore에 운반된 후 DNA는 핵 안으로 방출된다. 핵 안에서 선형 바이러스 DNA는 원형 DNA로 바뀐다. 전사, 바이러스 DNA의 자기복제 그리고 새로운 capsid의 조립등은 핵 안에서 이루어진다. 바이러스의 유전자는 숙주 세포의 RNA polymerase II에 의하여 전사가 되며 많은 바이러스의 단백질 인자들이 전사과정에 참여하고 있다. HSV-1의 유전자 발현은 정확히 조절되어 80개 이상의 유전자들이 각 kinetic class 별로 폭포식으로 차례대로 발현된다. HSV-1 유전자는 발현되는 시기를 기준으로 4가지의 class로 나눌 수 있다. 바이러스가 숙주 세포에 감염하였을 때 즉시 발현되는 α -유전자, α -유전자 산물이 존재할 때 발현되는 초기 유전자인 β -유전자, 그리고 바이러스 DNA 합성 이후에 발현되는 후기 유전자인 γ -유전자로 나눌 수 있다. 특히 후기 유전자중 상대적으로 일찍 발현되는 유전자를 Y1-유전자 그리고 늦게 발현되는 유전자를 Y2-유전자로 구분한다.

바이러스 genome의 UL과 US 끝에 위치하는 α -유전자의 단백질 산물은 각 kinetic class 유전자들의 발현을 조절하는 기능을 가지고 있어 α -유전자의

발현조절은 바이러스 증식의 가장 중요한 단계가 된다. β -유전자는 α -단백질이 존재하지 않으면 발현되지 않는다. 바이러스의 thymidine kinase와 DNA 축합효소와 같은 대부분의 바이러스 DNA의 합성과 바이러스 핵산의 대사에 관여하는 단백질들이 β -단백질에 포함된다. Glycoprotein 유전자들은 후기 유전자인 γ -유전자에 속하며 여러 가지 바이러스 α -단백질과 β -단백질에 의하여 전사과정이 조절을 받는다. 특히 α -단백질인 ICPO, ICP4, ICP27은 여러 class의 유전자 발현과정을 조절한다.

α -유전자의 산물중의 하나인 ICPO는 약 80 Kd의 분자량을 가지고 있으며 post-translational 변형에 의하여 110 Kd-124 Kd의 여러 형태를 가지게 된다. ICPO 유전자는 바이러스 복제에 필수적인 유전자는 아니지만 ICPO는 여러 kinetic class 유전자들의 전사를 강하게 transactivation 함이 알려졌다. ICPO mRNA의 일부분은 latent state에서 유일하게 발현되는 latency associated transcript (LAT) 과 antisense RNA를 이루어 ICPO의 발현 불능이 바이러스의 latency를 유지하는데 중요한 역할을 하리라 추측하고 있으나 아직도 결정적인 증거는 없다. ICP4는 핵안에 위치하고 있는 인산화된 단백질로 ICP4 유전자는 US 부위의 inverted repeat 부분에 위치하고 있어 2개의 유전자가 바이러스 genome 상에 존재한다. ICP4 유전자는 바이러스의 증식에 필수적인 유전자이며 클론된 ICP4 유전자를 이용한 transient expression 방법을 통하여 ICP4는 β 그리고 γ -유전자의 발현을 유도하고 ICP4 promoter 밑에 존재하는 유전자의 발현을 억제함이 확인되었다. HSV-1 genome의 UL에 위치하는 ICP27 유전자는 바이러스 증식에 필수적인 유전자로서, ICP27은 여 기능을 갖는 단백질이다. Transient transfection의 결과 ICP27 자체는 여러 종류의 target 유전자의 발현에 별로 영향을 주지 못하나 ICPO를 ICP4와 함께 적용하여 transactivator나 transrepressor로의 유도 작용을 나타낸다. α -유전자 산물인 ICPO, ICP4, ICP27의 연구는 viral transactivator와 general transcription factors와의 상호

작용이라는 점에서 중요한 연구의 대상이다.

따라서 본 과제에서는 생체내에서의 HSV의 핵산대사과정에 관여하는 유전자 기능을 연구하기 위하여 즉시초기 유전자 산물인 ICPO, ICP27의 발현 plasmids 와 mutant plasmids를 제조하고 바이러스 유전자 promoter가 reporter 유전자 앞에 삽입된 plasmids를 제조하여 숙주세포내 transient transfection을 통하여 즉시 초기 유전자 산물의 바이러스 유전자의 전사 조절 기능을 분석하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세포배양

Herpes simplex virus의 숙주세포인 Vero cell은 10%의 어린 소 혈청과 5%의 Antibiotics (Antibiotic-abtimycotic, Gibco)을 넣은 DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium) 배양액에 넣고 37℃의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. Transfection 방법

60 mm 조직 배양접시에 5 x 10⁵개의 세포를 하루동안 배양한 후 새로운 DMEM 배양액을 넣어 주었다. 2-4 시간이 지난 후에 DNA와 멸균 증류수, 2.5 M CaCl₂를 혼합하여 만든 250 ㎍의 2 x HeBS와 섞은 후 상온에서 20분간 방치하여 생성된 침전물을 배양접시에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 1 ml의 10% DMSO을 1분간 가하여 shock을 준 후 PBS로 여러번 세척하고 5 ml의 DMEM 배양액을 넣은 후 2일간 배양하였다. 배양 후 세포를 10 ml의 PBS로 세척하고 1 ml의 TEN 용액 (40 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl)을 넣은 후 cell scraper로 긁어낸 후 세포막을 파괴하기 위하여

-70℃에서 얼리고 37℃에서 녹이는 작업을 3회 반복하였다. 녹인 세포를 microcentrifuge한 다음 상층액을 취하여 -70℃에서 보관하였다. 이 상층액을 cell extract로 사용하였다.

3. CAT Assay

1 μ l의 C^{14} chloramphenicol (50 mCi/mmol), 2 μ l의 40 mM acetyl-CoA, 32.5 μ l의 1M Tris-Cl (pH 7.5) 완충 용액 그리고 84.5 μ l H_2O 가 들어있는 혼합액에 30 μ l의 세포추출액을 가하고 37℃에서 일정시간 동안 반응시킨 후 1 ml의 ethylacetate를 첨가하여 반응을 중지시키고, vortex mixer를 이용하여 혼합한 후 원심분리하여 유기층과 수용액층을 분리하였다. 분리된 유기층을 Speed Vac (Savant)을 이용하여 진공건조하였다. 건조된 시료를 10 μ l chloroform에 현탁한 후 silica TLC판 (Whatman PESILG)에 spotting하였다. TLC판을 1:1 chloroform/MeOH (vol/vol) 용매가 채워진 용기에 넣어 판막 크로마토그래피를 하였다. TLC판을 공기중에서 건조한 후 X-ray film을 TLC판 위에 놓아 autoradiogram을 만들었다.

제 3 절 결과 및 고찰

즉시 초기 유전자 산물인 ICP27의 발현 plasmid인 p27BS를 제조하였다. p27BS는 pBluescript plasmid의 BamH I 과 Sac I을 절단하고, 여기에 ICP27을 encode하는 유전자를 삽입시킨 plasmid 이다.

HSV의 α class의 ICP4 promoter를 CAT 유전자 앞에 삽입한 pICP4CAT, β class의 thymidine kinase promoter를 CAT 유전자 앞에 삽입한 ptkCAT, Y1 class의 promoter인 pVP5CAT, Y2 class의 promoter인 pL42CAT 등의 reporter

plasmid를 제조 또는 확보하였다. Vero cells 에서의 각각의 reporter plasmid 의 basal transcriptional level을 확인하기 위하여, 각 plasmid를 transfection한 후 CAT 활성도로 promoter의 활성도를 측정하였다.

각 reporter plasmid의 CAT 활성도는 pICP4CAT > ptkCAT > pVP5CAT > pL42CAT 순으로 pICP4CAT는 강한 CAT 활성도를 나타내었으나, pVP5CAT 와 pL42CAT의 경우 CAT 활성도는 거의 detect되지 않았다. (Figure 1).

ICP27이 각각의 promoter의 전사조절 양상을 확인하기 위해 p27BS를 각 유전자의 reporter plasmid와 함께 Vero cell에 cotransfection을 하였다. (Figure 2) pICP4CAT의 경우, ICP27의 존재시에 ICP27이 없을 때에 비하여 CAT 활성도가 현저히 감소하였다. 이 결과로 볼 때 α 유전자산물인 ICP27이 α 유전자 promoter의 전사조절에 관여하여, transrepression 하는 것으로 사료된다. 그러나 ptkCAT, pVP5CAT 그리고 pL42CAT은 basal level의 CAT 활성도가 너무 약해서 ICP27에 의한 promoter의 전사조절 양상을 확인할 수가 없었다.

제 4 절 참고문헌

1. Ahn, J. K. (1991) Mol. Biol. News 3, 20-28.
2. Hardwicke, M. A., Sekulovich, R. E. Vanughan, P. J., O'conner, R., and Sandri-goldin, R. M. (1989) J. Virol. 63, 4590-4602.
3. Hardwicke, M. A., Sandri-goldin, R. M., and Rozanne, M. (1994) J. Virol.

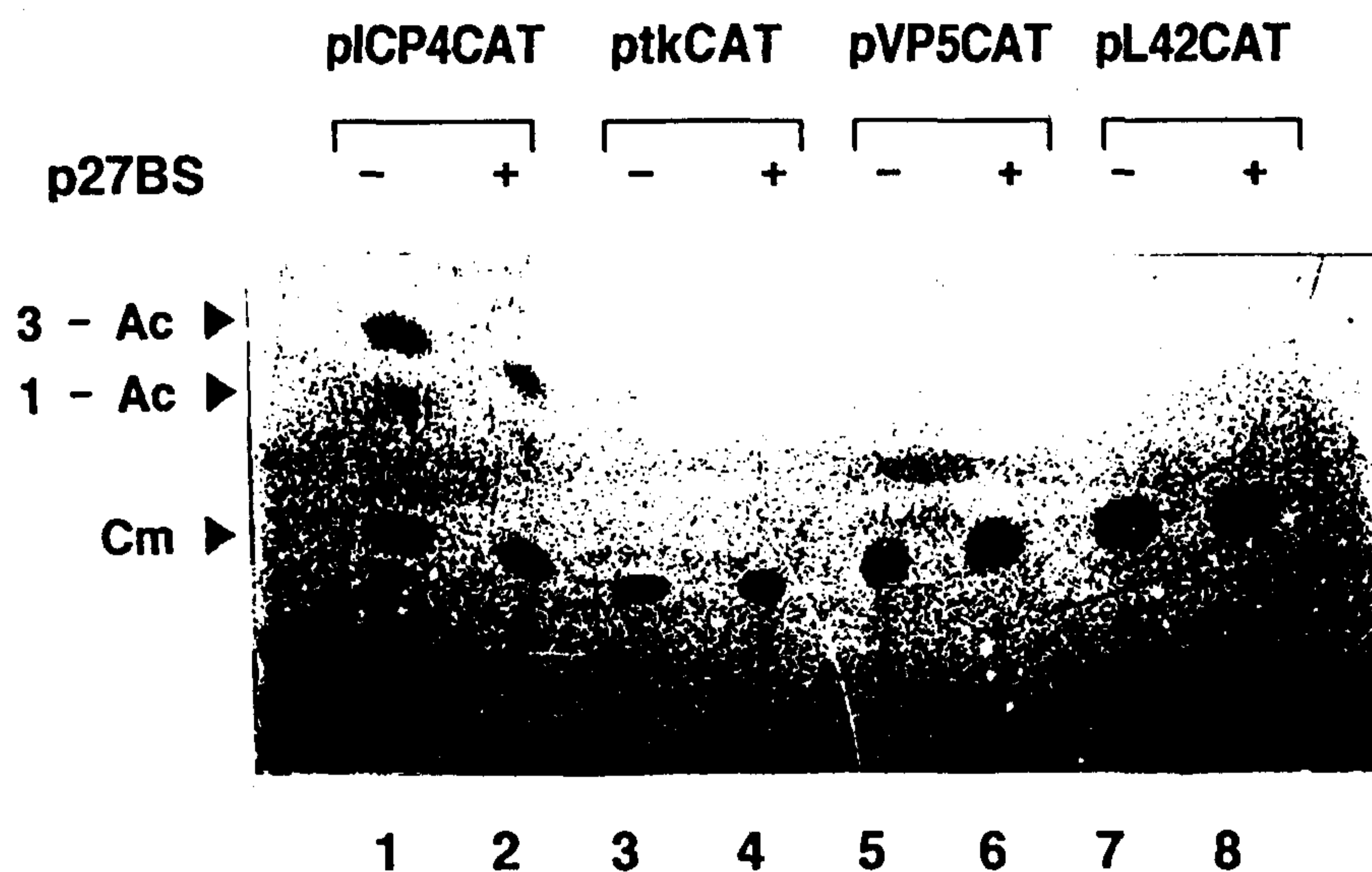


Figure 2. Autoradiogram of CAT assay that shows transcriptional regulation of HSV promoters by ICP27.

3 μ g of each reporter CAT plasmid was cotransfected into Vero cell with p27BS(-, no p27BS; +, 2 μ g of p27BS). Cm, Chloramphenicol; 1 - Ac, 1 - acetyl chloramphenicol; 3 - Ac, 3 - acetyl chloramphenicol.

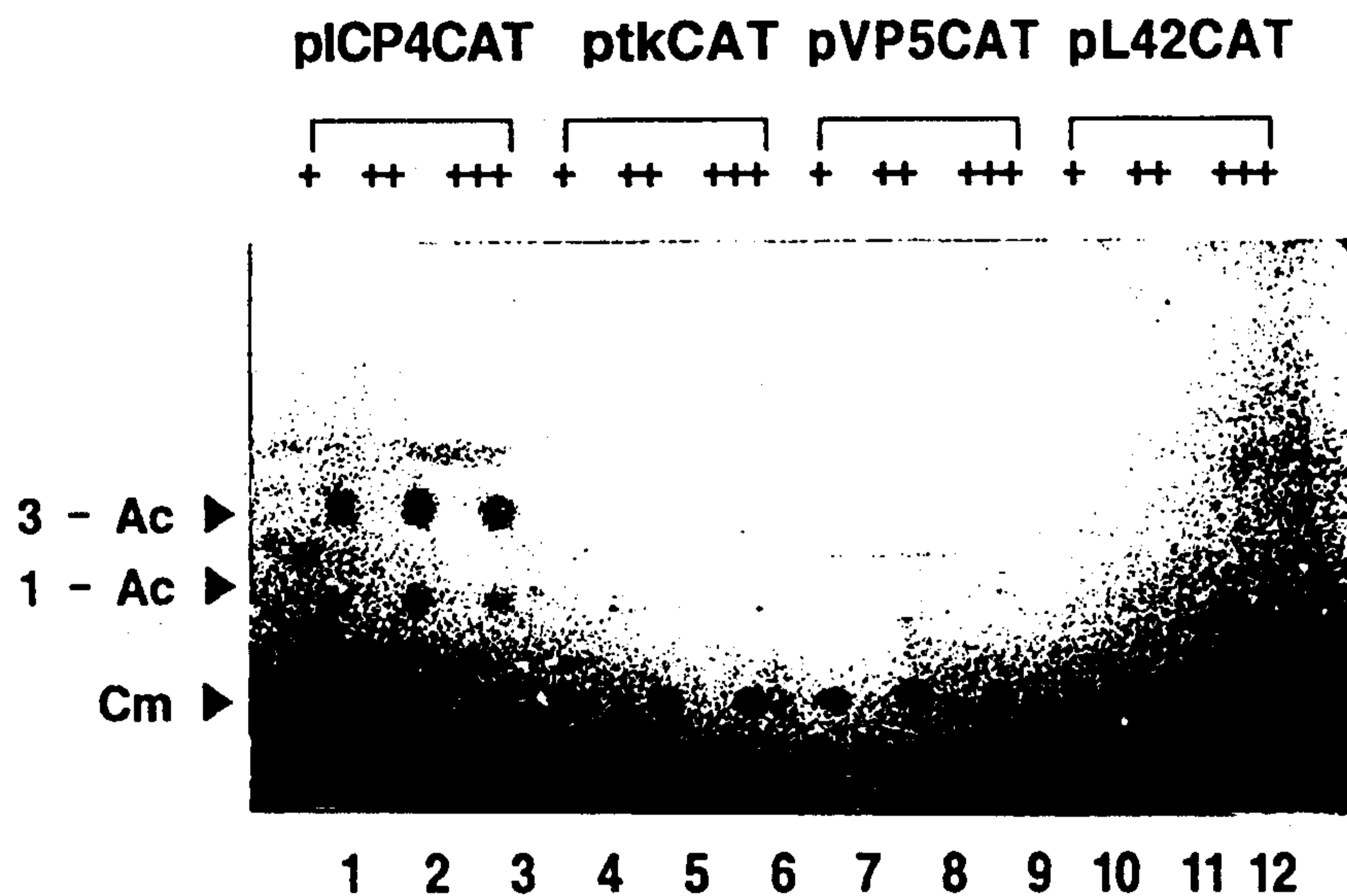


Figure 1. Autoradiogram of CAT assay that shows activities of HSV promoters.

Vero cells were transfected by various amounts of pICP4CAT, ptkCAT, pVP5CAT and pL42CAT plasmid (+, 1 μ g; ++, 2 μ g; +++, 3 μ g). lane 1-3, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g of pICP4CAT; lane 4-6, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g of ptkCAT; lane 7-9, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g of pVP5CAT; lane 10-12, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g of pL42CAT. Cm, Chloramphenicol; 1 - Ac, 1 - acetyl chloramphenicol; 3 - Ac, 3 - acetyl chloramphenicol.

68, 4797-4810.

4. McMahan, L., and Schaffer, P. A. (1990) *J. Virol.* 68, 4797-4810.

5. Rice, S. A., Su, L., and Knipe, D. M. (1989) *J. Virol.* 63, 3399-3407.

6. Rice, S. A., Knipe, and D. M. (1990) *J. Virol.* 64, 1704-1715.

7. Sekulovich, R. E., Leary, K., and Sandri-goldin, R. M. (1988) *J. Virol.* 62, 4510-4522.

8. Zhu, Z., and Schaffer, P. A. (1995) *J. Virol.* 69, 49-59.

제 6 장 암세포 분화시 이노시톨 인지질 대사의 변화

제 1 절 서설

세포의 수용체에 agonist들이 결합하거나 세포가 transformation되면 phosphatidylinositol의 세포내의 대사 속도 증가와 phosphatidylinositol의 빠른 인산화가 주로 관찰된다. Inositol 인지질의 대사 증가는 처음에 Rous sarcoma virus (RSV)에 의해 transformation된 quail 세포에서 처음으로 관찰되었다 (Diringer and Friis, 1977). Kaplan 등 (1986)은 polyoma virus에 의한 transformation이 phosphatidylinositol의 대사를 증가시킨다는 것을 보고하여 inositol phospholipid와 polyoma virus에 의한 transformation의 밀접한 관계를 밝혔다. 그리고 Countneidge와 Heber (1987)은 polyoma 파건의 middle T antigen이 phosphatidylinositol kinase인 P81과 complex를 이루어 polyoma virus에 의해 매개되는 transformation에 작용한다고 보고하였다.

또한이외에도 inositol phospholipid가 정상 세포의 transformation에 관여한다는 보고는 몇가지 더 있다. Rous sarcoma virus의 oncogene product인 p60v-src (Sugimoto et al., 1984)와 p68gag-ros (Macara et al., 1984) 그리고 erbB virus의 oncogene product (Kato et al., 1987)는 phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol monophosphate (PIP)와 diacylglycerol을 인산화 시키는 lipid kinase의 활성을 가지고 있음이 보고되었다. 이러한 inositol phospholipid의 증가된 인산화와 대사의 활성은 이차 신호 전달 물질의 생성을 증가시켜 세포의 형질 변환을 가져 온다고 생각되어지고 있다.

Inositol phospholipid의 가수분해에 따라 생겨나는이차 신호 전달 물질이 세포의 성장과 transformation에 관여한다는 보고는 아주 많다 (reviewed in

Majerus et al., 1990). 이러한 신호전달 물질의 생성은 phosphatidylinositol의 인산화와 가수분해에 의해 일어난다. Phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂)의 phospholipase C (PLC)에 의한 가수분해는 protein kinase C의 활성화제로 잘 알려진 diacylglycerol과 endoplasmic reticulum으로부터 calcium을 유리시키는 inositol trisphosphate (IP₃)의 생성을 일으킨다. 또한 이러한 신호 전달 물질의 생성에 의한 PKC 활성화는 세포 성장과 분화에 중요한 요소라는 사실이 밝혀졌다 (Nisizuka, 1986, 1988; Majerus et al., 1986). 또한 PLC는 세포막에 존재하는 수용체의 tyrosine kinase activity에 의하여 인산화 된다는 사실 또한 밝혀졌고 (Kumajin et al., 1989; Kim et al., 1990) 이러한 PLC의 인산화는 epidermal growth factor (EGF)와 platelet derived growth factor (PDGF)의 처리에 의해 유도되어진다 (Margolis 1989; Margolis et al., 1990; Kim et al., 1991). 이러한 사실들을 바탕으로 인산화의 증가는 virus나 chemical에 의해 transformation된 세포의 이차 신호 전달 물질의 양의 증가와 관련이 있으리라는 것을 추측할 수 있다. 또한 이러한 신호 전달 물질들은 세포 내의 간극 연결을 통해 다른 세포로 직접 이동됨으로써 인접한 세포간의 신호 전달을 매개할 수 있다. 따라서 간극 연결을 통한 신호 전달의 조절도 암화 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

세포의 transformation을 유도하는 세포내 신호 전달과정을 알아보기 위하여 본연구에서는 murine 세포를 bovine papilloma virus와 화학적 발암원을 이용하여 transformation 시켜 세포내 inositol phospholipid metabolism을 알아보았다. 그리고, 잘알려진 tumor promoter인 TPA를 사용해서 세포 transformation 과정중에 일어나는 세포간의 신호 전달 물질의 이동이 변화하는지를 scrape-loaded dye transfer method를 이용해서 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

[2-³H]-*myo* inositol (20.8 Ci/mmol)은 Amersham으로부터 구입하였고 anion exchange resin (AG 1x8, in the formate form, 200-400 mesh)는 Bio-Rad 제품을 사용하였다. 다른 시약은 analytical grade의 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

마우스 fibroblast인 C 127로부터 BPV type I에 의해 transformation된 마우스 ID13 세포를 10%(v/v)의 bovine fetal calf serum이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 유지하였다. ID13 세포는 100에서 150 copy의 BPV-1 DNA를 핵속에 보유하고 있다 (Law et al., 1981). NIH 3T3 세포의 화학적 transformation은 세포의 3 μ g/ml의 3-MC (3-methylcholanthrene)를 Rhee et al.(1990)의 방법에 따라 처리하여 얻었다.

2) Inositol phospholipid metabolism

Inositol phospholipid의 metabolites를 정량하기 위하여 세포를 20 μ Ci/ml의 [³H]-*myo* inositol이 함유된 배지에 24시간동안 배양하였다. 세포를 수확하기 위해 100 mm culture dish 당 2 ml의 20% ice cold trichloroacetic acid를 가하였다. Inositol phosphate를 추출하기 위하여 0.1 N HCl과 CH₃OH/CHCl₃ (37:19) 용액을 산에 의해 침전된 세포 침전에 가하였다. 방사선으로 표지된 phosphatidylinositol phosphate는 MacDonald et al. (1987)의 방법에 의하여 얇은 막 크로마토그래피 방법으로 분리하였다. 수용액층의 inositol phosphate는

Dowex AG 1x8 formate column을 사용하여 분리하였다. (Kikuchi et al., 1986). 이들의 방사선 정량은 liquid scintillation counting을 통하여 실시 하였다.

3) 간극 연결을 통한 세포간의 신호 물질 투과도의 측정

세포내 간극 연결에 의한 물질의 투과도를 측정하기 위하여 monolayer로 키워진 세포를 PBS로 두 번 씻은 후 0.5% lucifer yellow/PBS(w/v) 용액을 세포에 가했다. 염색액 위로 메스를 이용하여 상처를 내고 30초 후에 염색액을 따라 내고 PBS로 다시 3회 씻었다. 상처를 낸 시간으로부터 3.7% formaldehyde/PBS 용액을 시료에 부어 고정 시켰다. 고정된 세포를 형광 현미경을 이용해 관찰했다.

TPA에 의한 세포 간극 투과 억제를 보기 위하여, semiconfluent 상태로 키운 배양세포를 0.2 mM의 TPA를 10분간 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누어 위에서 언급한 방법에 의해 형광물질의 투과도를 측정함으로써 세포간의 신호 물질 전달의 정도를 간접적으로 측정하였다.

4) Western Blotting

TPA를 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 세포를 수확하여 초음파 분쇄한 뒤 원심 분리하여 찌꺼기를 제거했다. 상등액을 다시 TL-100 ultracentrifuge에서 45,000 rpm 으로 원심 분리하여 막부분을 침전시켰다. 이 막부분에 존재하는 connexin을 8% DSD-PAGE상에서 분리한 후, nitrocellulose 막에 흡착 시키고, 이를 1% skim milk (v/v) 용액에 담가 비특이적으로 결합을 막았다. Connexin에 대한 1차 결합은 Zymed laboratory에서 구입한 mouse monoclonal anti-connexin 43 antibody를 이용하여 수행하였다.

제 3 절 결과

Virus나 chemical carcinogen에 의하여 transformation된 세포의 inositol phospholipid 대사의 변화가 있는가를 알아보기 위하여 bovine papilloma virus로 transformation된 ID13 세포와 3-MC로 transformation된 NIH 3T3 세포내의 inositol phospholipid 대사물의 농도를 측정하였다. BPV-1에 의해 transformation된 마우스 C 127 세포는 BPV-1 DNA의 multiple copy를 extra chromosome에 가지고 있는 ID13 세포를 의미한다. 다른 종류의 virus에 의한 transformation과는 달리 transformation 상태의 유지는 integration되지 않은 viral genome에 의해 지속된다 (Law et al., 1981). NIH 3T3 세포는 transformation을 위하여 잘 알려진 발암물질인 3-MC를 처리하였다. Transformed foci를 배양 접시로부터 분리하여 별도로 배양하여 transformation된 세포주를 유지하였다.

Virus와 3-MC에 의한 transformation에 의하여 그림 1과 2에서 보듯이 PIP와 PIP₂의 양은 대조 군에 비하여 증가하는 추세를 나타내었다. [³H]-myo inositol로부터 PIP와 PIP₂로의 증가한 ³H 유입은 두종류의 transformation된 세포에서 공통적으로 관찰되었다. 또 virus에 의한 transformation의 경우에는 PI로의 ³H 유입이 조금 감소하는 경향을 나타내었다.

그림 3과 4는 transformation된 세포와 대조군사이의 세포내 inositol phosphate 양의 비교를 나타낸다. [³H]-myo inositol로 표지된 세포를 유기용매로 extraction 하여 수용액 층을 얻어 anion exchange chromatography를 통하여 inositol phosphate를 분리하였다. 가장 극성이 약한 IP가 제일먼저 elution 되었고 가장 극성이 강한 IP₄가 가장 나중에 elution 되었다. BPV-1에 의하여 transformation된 ID13 세포는 virus에 감염되지 않은 모세포인 C 127

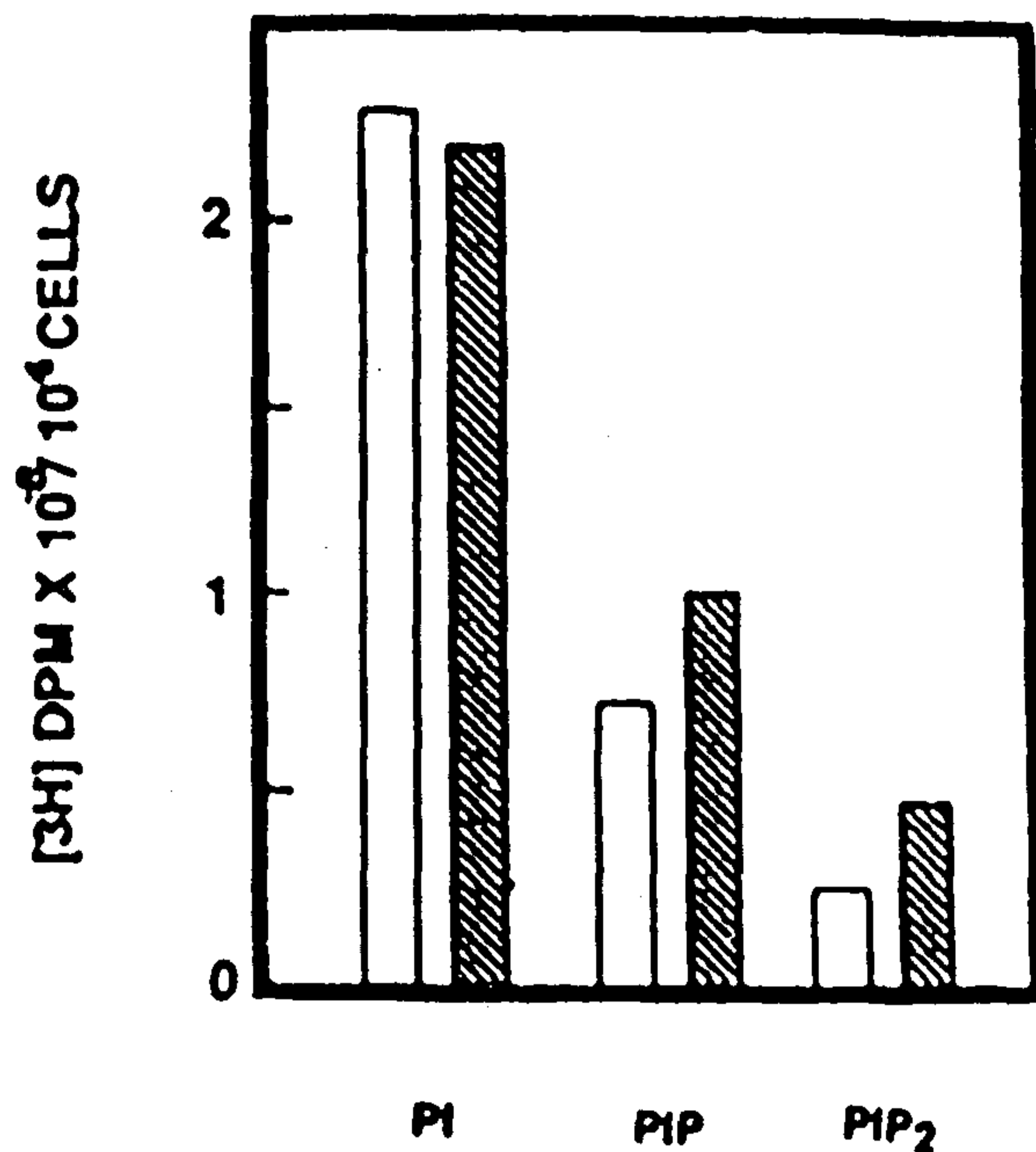


Fig. 1. Comparison of phosphatidylinositol metabolites in C 127 and ID 13 cells. Cells were labeled for 24 h with [³H]-*myo* inositol, and the levels of phosphatidylinositol metabolites were standardized with respect to total labeling in the sample preparations. Labeled phosphatidylinositol derived from mouse C 127 cells (□) or from ID 13 cells (▨) transformed from C 127 cells by BPV-1 were separated on TLC. Fractions for 2 mm were scraped off from the TLC plate and radioactivities were measured in the liquid scintillation counter.

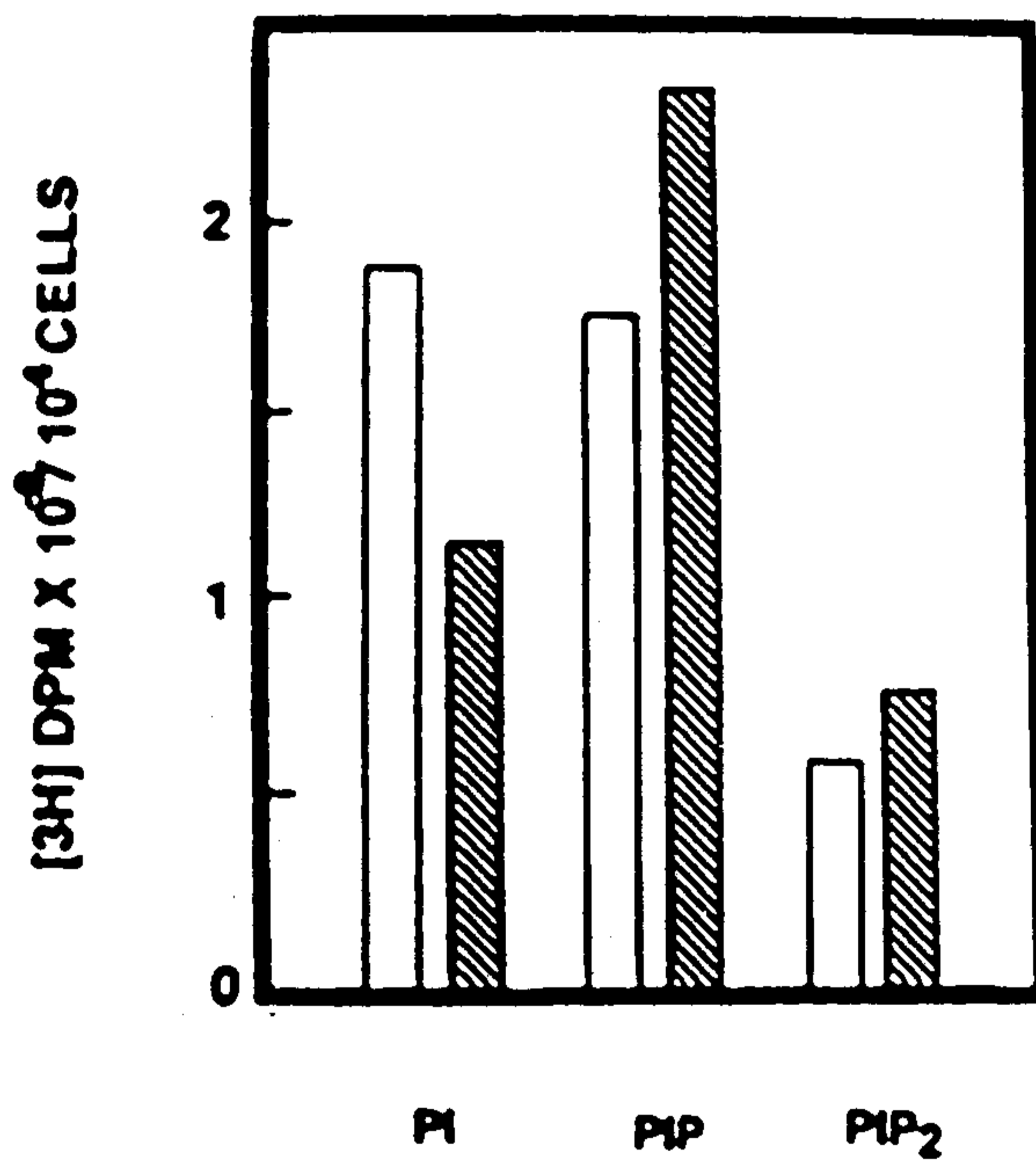


Fig. 2. Comparison of phosphatidylinositol metabolites in nontransformed and 3-methylcholanthrene transformed NIH 3T3 cells.

Chemical transformation of NIH 3T3 cells were carried out using 3 $\mu\text{g/ml}$ of 3-MC as described in Methods. Other experimental procedures were the same as in Fig. 1.

□ : nontransformed NIH 3T3 cells.

▨ : 3-MC transformed NIH 3T3 cells.

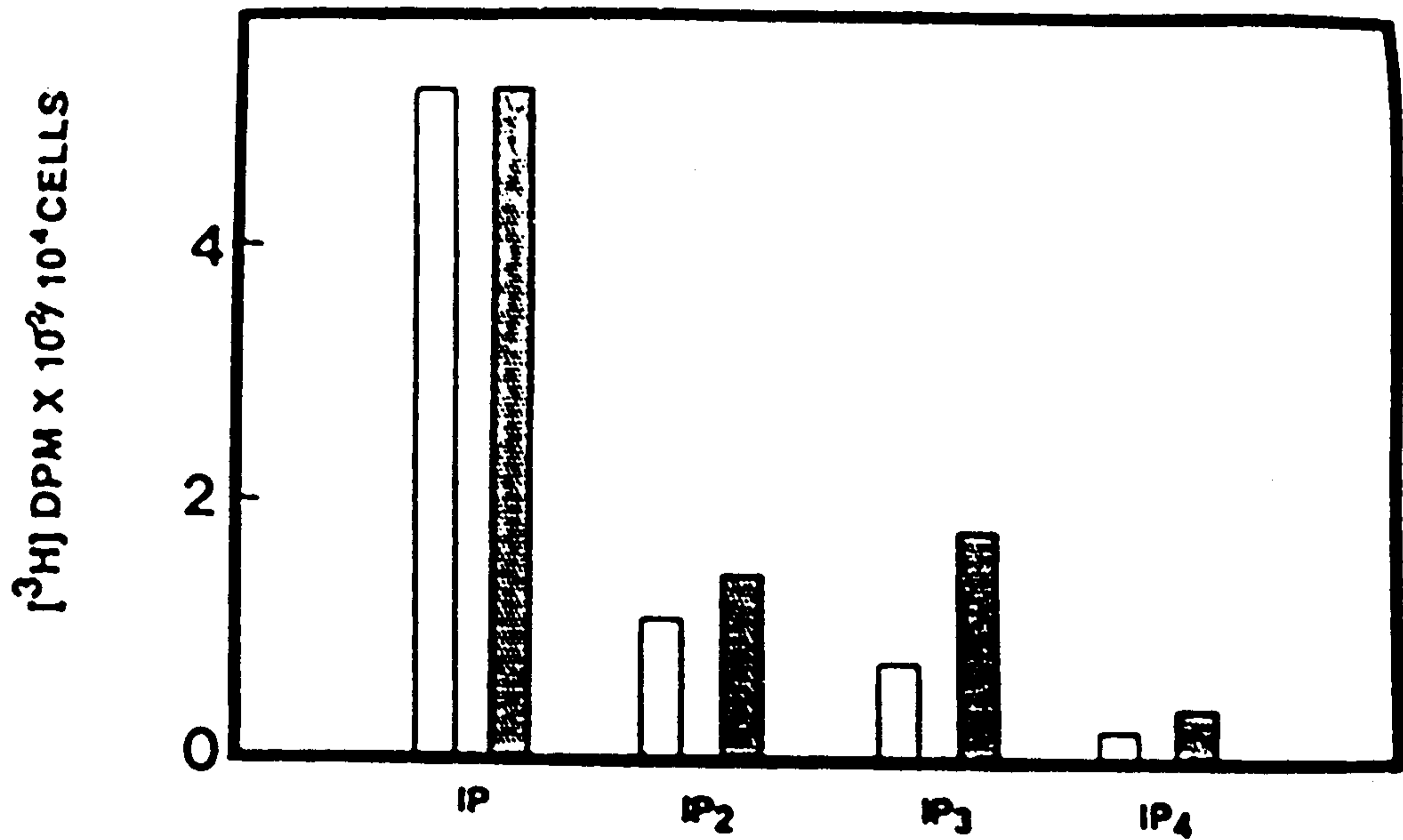


Fig. 3. Inositolphosphate metabolism in mouse C 127 and ID 13 cells. Inositol phosphates were separated as described using anion exchange column chromatography (Kikuchi *et al.*, 1986). Fractions of 2 ml each were collected and the radioactivities of each fraction containing IP₁, IP₂, IP₃ and IP₄ was determined.

□ : C 127 cells

▨ : ID 13 cells

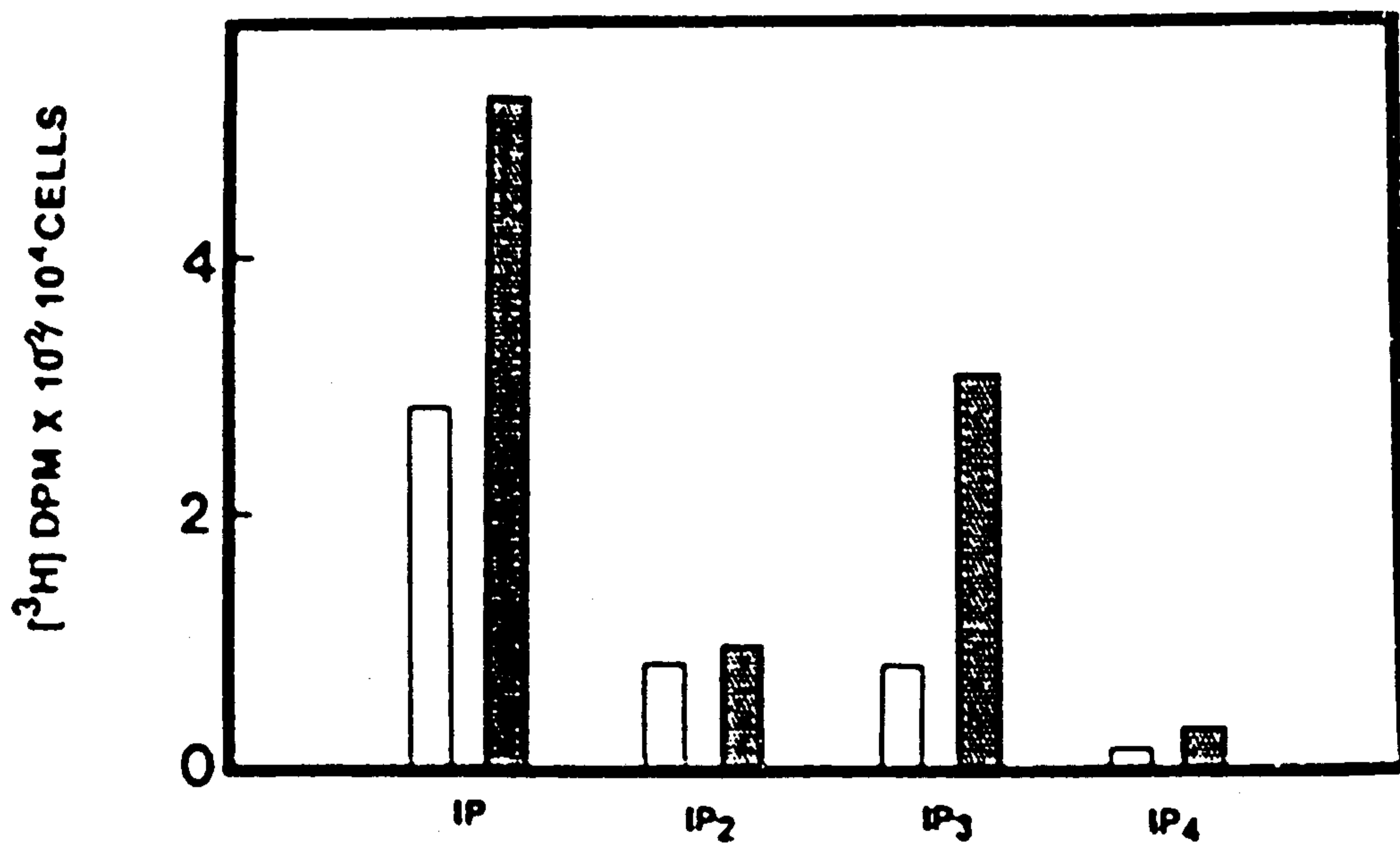


Fig. 4. Inositolphosphate metabolism in nontransformed and transformed NIH 3T3 cells. NIH 3T3 cells were transformed by treatment of 3-MC as described in Methods. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

□ : nontransformed NIH 3T3 cells

▒ : 3-MC transformed NIH 3T3 cells

세포에 비하여 IP3 양이 3배 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 3-MC에 의하여 transformation 된 NIH 3T3 세포에서도 유사한 결과를 얻었다.

잘 알려진 tumor promoter인 TPA를 배양 세포에 처리한 결과 대조군에 비해 간극 연결을 통한 세포간의 물질 투과도가 급격히 감소한다는 사실을 scrape-loaded dye transfer 방법에 의해 확인되었다. 또한 각각의 경우에 대해 western blotting을 수행한 결과 간극 연결 단백질의 인산화가 급격히 증가함을 알수 있었다 (그림 5).

제 4 절 고찰

세포의 성장 조절과 inositol phospholipid 대사와의 밀접한 관계에 대하여는 많은 보고가 있다. (Majerus et al., 1990; Berridge and Irving, 1989). Inositol phospholipid 대사의 변화는 protein kinase 들의 활성을 조절하여 세포의 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Phosphatidylinositol로부터 유래된 diacylglycerol은 protein kinase C의 cofactor로 작용하고 IP3는 Ca^{2+} 를 세포내 저장소로부터 세포질로 유래시켜 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase 들을 활성화 시킨다. 이렇게 하여 증가된 protein kinase C의 활성화에 의하여 Swiss 3T3 세포에서 *c-myc* 과 *c-fos*의 oncogene expression이 증가된다는 보고도 있다 (Kaibuchi et al., 1986; Tsuda et al., 1986). Transformation 과정에 protein kinase C가 관여하리라는 생각은 phosphodiester tumor promoter가 protein kinase C의 직접적인 활성화제라는 사실에 의하여 뒷받침된다. 알려진 phosphodiester tumor promoter 중 12-O-tetradecanylphorbol 13 acetate(TPA)는 세포의 성장과 분화에 많은 효과를 나타낸다 (Nishizuka, 1986). 또 이러한 증거와는 반대로 PLC와 PKC의 활성화가 반드시 세포의 성

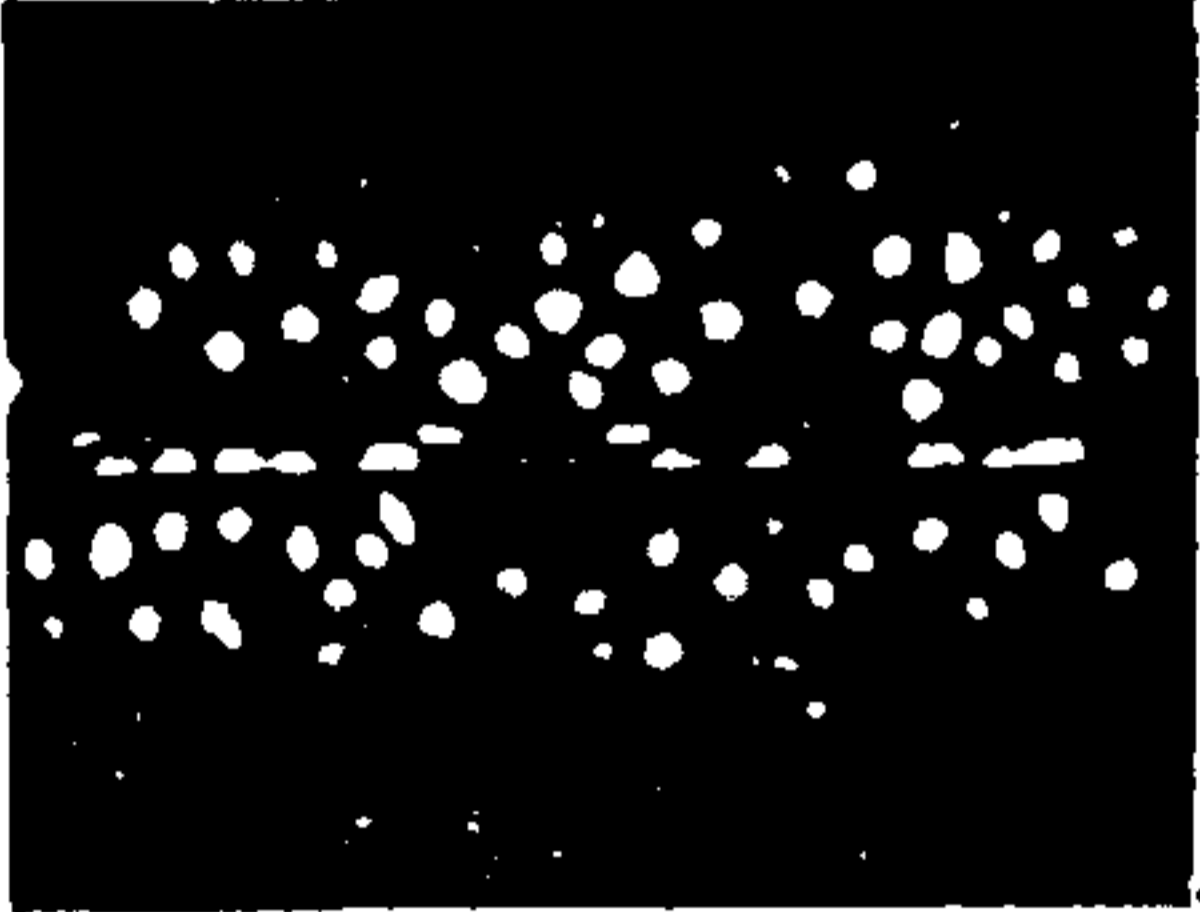
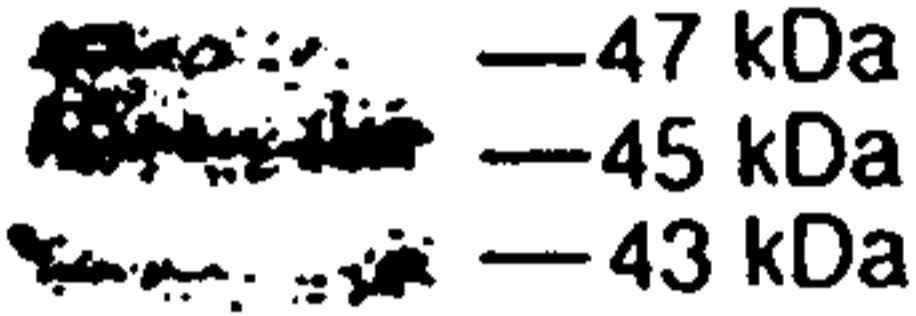

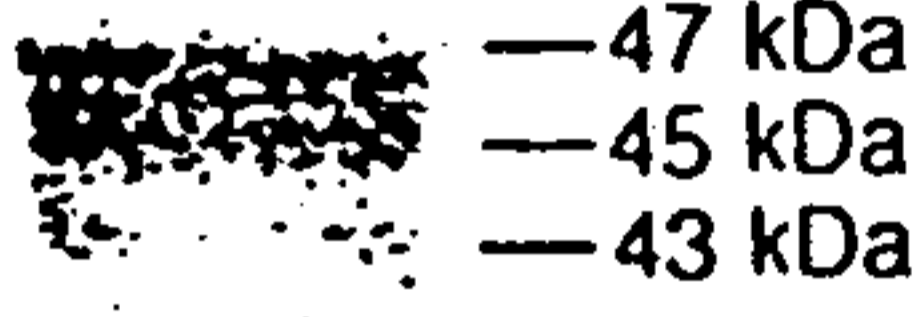
Treatment	Communication	Connexin 43 Isotypes
Control		
0.2mM TPA		

Fig. 5. Inhibition of gap junctional communication by TPA and increase of phosphorylated isotype of connexin 43 protein in clone 9 cells. Synchronized clone 9 cells at G₀ phase were treated with 0.2 mM TPA for 10 min and the effect of TPA on gap junctional communication was compared with the control culture. The states of phosphorylation connexin 43 protein was analyzed by the immunoblot analysis. The 47 kDa and 45 kDa protein represent phosphorylated isotypes of connexin 43.

장과 분열에 필요한 요소가 아니라는 보고도 있다. 예를 들자면 CSF-1과 같은 성장 인자는 *c-fms*에 의하여 transfection된 NIH 3T3 세포에서 PLC의 활성화 없이 mitogenic response를 일으킨다 (Downing et al., 1989). 그리고 PKC의 antimitogenic action은 많은 세포 주에서 보고되었다 (Kawahara et al., 1988).

본 연구는 이러한 상반되는 보고들을 절충하고 inositol phospholipid 대사 물질인 이차 신호전달 물질의 명확한 역할을 알아내려는 시도의 일환으로 진행되었다. 본 연구의 결과는 virus DNA에 의한 transfection이나 chemical carcinogen의 처리에 의하여 유도되는 세포의 phenotype의 변화는 inositol phospholipid의 인산화와 가수분해정도의 변화를 수반한다는 사실을 보여준다.

제 5 절 참고문헌

Berridge M.J. and Irvine R.F. (1989) Nature 341, 197-205.

Courtneidge S.A. and Heber A.(1987) Cell 50, 1031-1037.

Diringer H. and Friis R.R. (1977) Cancer Res. 37, 2979-2984.

Downing J.R., Margolis B.L., Zilberstein A., Ashmun R.A., Ulrich A., Sherr C.J. and Schlessinger J. (1989) EMBO J. 8, 3345-3350.

Kaibuchi K., Tsuda T., Kikuchi A., Tanimoto T., Yamashita T. and Takai Y. (1986) J. Biol. Chem. 261, 1187-1192.

Kaplan D.R., Whitman M., Schaffhausen B., Raptics L., Garcea R.L., Pallas D., Rberts T. M. and Cantley L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3624-3628.

Kato M., Kawai S. and Takenawa T. (1987) J. Biol. Chem. 262, 5696-5704.

Kawahara Y., Karia, K., Fukumoto Y., Fukazaki H. and Takai, Y. (1986) In cell Differentiation Genes and Cancer (Edited by Kakunaka T., Sugimura T., Tomatis L. and Yamasaki H.) pp. 102-117. IARC Scientific Publication No. 92, Lyon, France.

Kikuchi, A., Kozawa O., Hammamori Y., Kaibuchi K. and Taki Y.(1986) Cancer Res. 46, 3401-3406.

Kim H.K., Kim J.W. Ziberstein A., Margolis B., Kim J.G., Schlessinger J. and Rhee S.G. (1991). Cell 65, 435-441.

Kim J.W., Sim S.S., Kim U.H., Nishibe S., Wahl M.I., Carpenter G. and Rhee S. G. (1990) J. Biol. Chem. 265, 3940-3943.

Kumjian D.A., Wahl M.I., Rhee S.T. and Daniel T.O. (1989) Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 8232-8236.

Law M.F., Lowry D.R., Dvoretzky I. and Howley P.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2727-2731.

Macara I.G., Marinetti G.V. and Balduzzi P.C. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2728-2732.

MacDonald M.L., Mack K.F. and Glomset J.A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1105-1110.

Majerus P.W., Connolly T.M., Deckman H., Ross T.S., Bross T.E., Ishii H., Basal V.S. and Wilson D.B. (1986) Science 234, 1519-1526.

Margolis B., Rhee S.G., Felder S., Mervic M., Lyall R., Levitzki A. Ullrich A. Ziberstein A. and Schlessinger J. (1989) Cell 57, 1101-1107.

Margolis B., Ziberstein A., Franks C., Felder S., Kremer S., Ullrich A., Rhee S.G., Skorecki, K and Schlessinger J. (1990) Science 248, 607-610.

Nishizuka Y. (1986) Science 233, 305-312.

Nishizuka Y. (1988) Nature 344, 661-665.

Rhee Y. H., Ahn J.H., Choe J., Kang K.W. and Joe C.O. (1990) Planta Med. 57-128.

Sugimoto Y., Whimam M., Cantley L.C. and Erikson R.L. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2117-2121.

Tsuda T., Hamamori Y., Yamashita T., Fukumoto Y., and Takai Y. (1986)

FEBS Lett. 208. 39-42.

제 7 장 Aptamer 기술의 모델시스템 : RNase P의 단백질 성분에 결합하는 RNA aptamer의 선별 및 특성

제 1 절 서 설

모든 tRNA 유전자의 전사후 합성되는 생성물이 기능적으로 성숙한 tRNA가 되기 위해서는 여러 종류의 효소가 관여해야한다 (1). 성숙한 tRNA의 5'-말단은 endonuclease인 ribonuclease P (RNase P)라는 단 한 효소의 작용만으로 가공되어 만들어진다 (2). 이 효소는 생체내 모든 세포나 세포소기관에서 존재하며, 특히 대장균 (*Escherichia coli*)과 *Bacillus subtilis*에 대한 정보가 가장 많이 축적되어있다. 대장균 RNase P는 한 분자의 RNA 성분 (M1 RNA, 377 nucleotides (nt))과 단백질 성분 (C5 단백질, 119 아미노산 잔기, 13.8 kDa)으로 각각 구성된 ribonucleoprotein이다 (3, 4). 이 효소의 기질로는 tRNA 전구체 이외에도 4.5S RNA와 10Sa RNA의 전구체가 알려져있다 (5). 한편 RNase P 완전효소 (holoenzyme)의 효소작용의 중심부는 M1 RNA의 RNA 성분이다 (6). 시험관내 (*in vitro*) 고농도의 Mg^{2+} 존재하에서 M1 RNA는 C5 단백질 성분 없이도 혼자서 tRNA 전구체를 가수분해할 수 있다. 즉 RNase P의 효소작용은 M1 RNA에 의한 결과이며 C5 단백질은 보조인자로 참여한다. 그러나 생체내에서 (*in vivo*) RNase P의 효소활성은 반드시 M1 RNA와 C5 단백질이 존재해야 나타난다 (7).

대장균 RNase P의 단백질 성분인 C5 단백질은 매우 염기성이 강하다. 이 단백질은 25%의 염기성 아미노산 잔기를 가지고 있다. C5 단백질은 낮은 이온세기의 완충용액에서 M1 RNA가 tRNA 전구체를 절단할 수 있도록 도와준다. 이 때 효소의 절단 속도는 높은 이온세기의 완충용액에서 M1 RNA만에 의한

것보다 대략 10 - 20 배 정도 증가된다 (6, 8). C5 단백질은 M1 RNA의 기질에 대한 특이성을 더욱 다양하게 해준다 (9). C5 단백질은 M1 RNA와 결합하며 또한 다른 세포의 RNase P RNA 성분과도 결합하며 그 RNA의 효소 활성을 뛰게 도와준다 (6, 10). RNase P RNA는 tRNA 전구체와 결합할 때 정전기적 반발이 발생한다. RNase P 단백질은 이들간의 정전기적 반발을 약화시켜 효소-기질의 결합을 용이하게 해주는 역할을 한다 (11). 그러나 RNase P 단백질의 기능은 아직도 명확히 결정된 것은 아니다. RNase P 완전효소의 기질에 대한 특이성은 tRNA 전구체와 non-tRNA 전구체에서 달리 나타나고 (12), 생체내에서 M1 RNA의 구조적 변이로 인한 효소 활성의 변화를 완화시킬 수 있으며 (13), M1 RNA의 여러 기질에 대한 절단자리의 선택에도 C5 단백질이 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다.

대장균 RNase P 완전효소의 구성 성분간 상호작용에 대한 정보는 아직도 많이 부족하다. C5 단백질의 M1 RNA 인식은 기존의 RNA-결합 단백질이 특정 RNA 구조를 인식하는 것과는 다른 양상을 보인다 (14). 이들간의 상호결합 양상을 이해하기 위해서 본 연구는 최근 많이 활용되고 있는 시험관내 선별법 (*in vitro* selection)을 채택했다 (Fig. 1, 15). 어떤 리간드에 결합하는 비교적 작은 크기의 핵산을 무수한 집단에서 분리해내는 이 실험 방법은 매우 강력한 기술이다. 연속적 반복을 통해서 얻은 핵산들은 결합에 중요한 요인을 공유하게 된다. 여기서 구한 정보는 기존의 돌연변이화나, 계통발생학적, 생화학적 접근과 상호보완적일 수 있다. 본 연구에서는 대장균 RNase P 단백질에 결합하는 RNA aptamer를 선별했다. 실험의 편의를 위해서 C5 단백질을 말토스-결합 단백질 (maltose-binding protein, MBP)에 융합시켰다. 무작위 핵산 집합체는 42 nt의 무작위 서열을 가진 총 120 nt의 길이로 정했다. 실험을 15 회 반복 선별한 후 클로닝하여 각 aptamer를 DNA 염기서열로 구분하였다.

Aptamers에 대한 구조 분석은 핵산-단백질간의 특이한 상호 인식 기작을

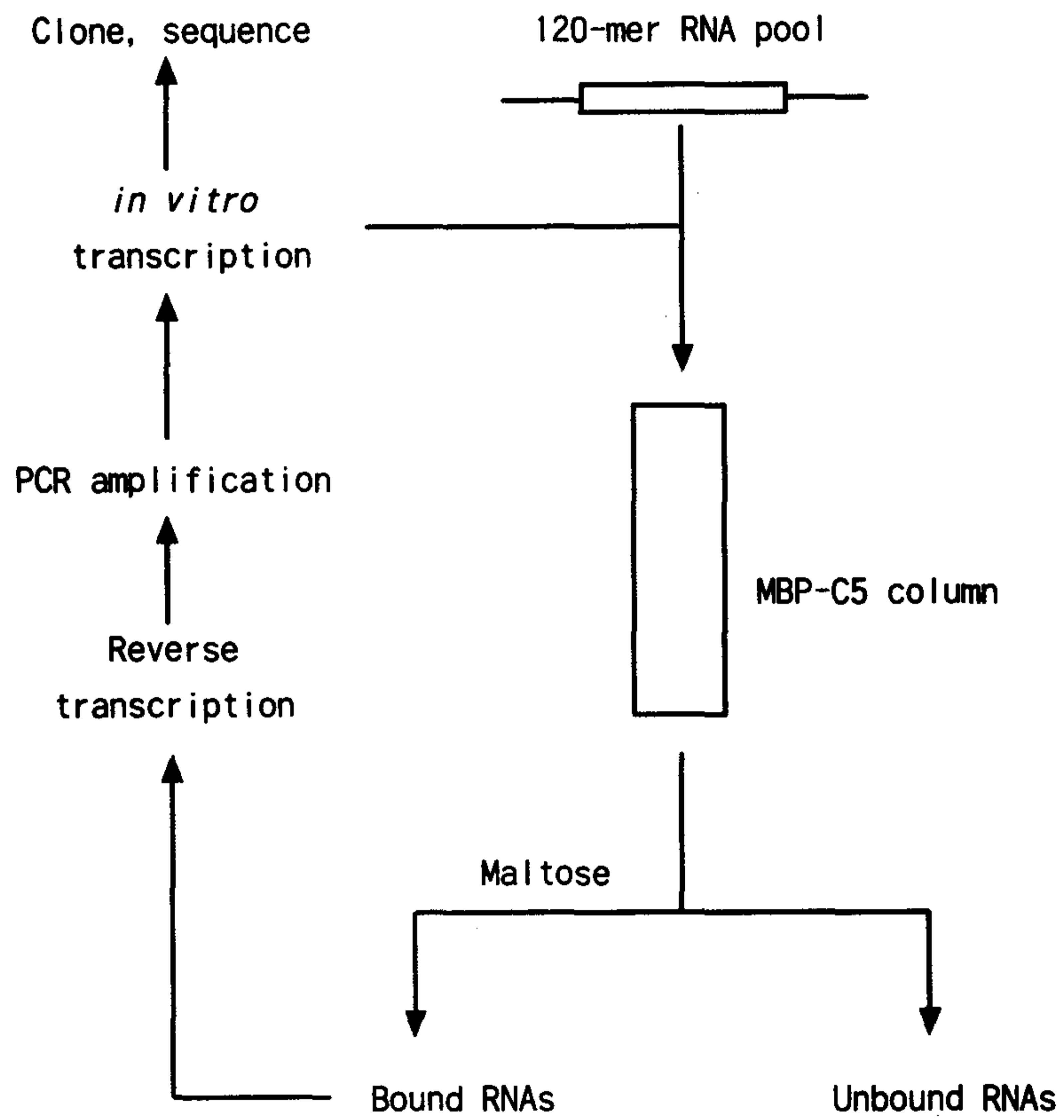


Fig. 1. Selection for C5 protein-binding RNA molecules by means of affinity chromatography.

연구하는 데 중요한 정보를 제공해준다 (16). 시험관내 선별법으로 C5 단백질에 결합하는 RNA aptamers의 성질을 파악하게 되면 RNase P 완전효소의 구성 성분간 결합 양상과 C5 단백질의 또다른 가능한 역할도 유추할 수 있을 것이다. 최근 RNase P가 유전자 치료법에 응용 가능하다는 보고는 다른 리보자임 (ribozyme)보다 유리한 점을 가진 이 효소의 관심이 증가되고 있다 (17).

제 2 절 재료 및 방법

1. 무작위 핵산 집합체의 합성.

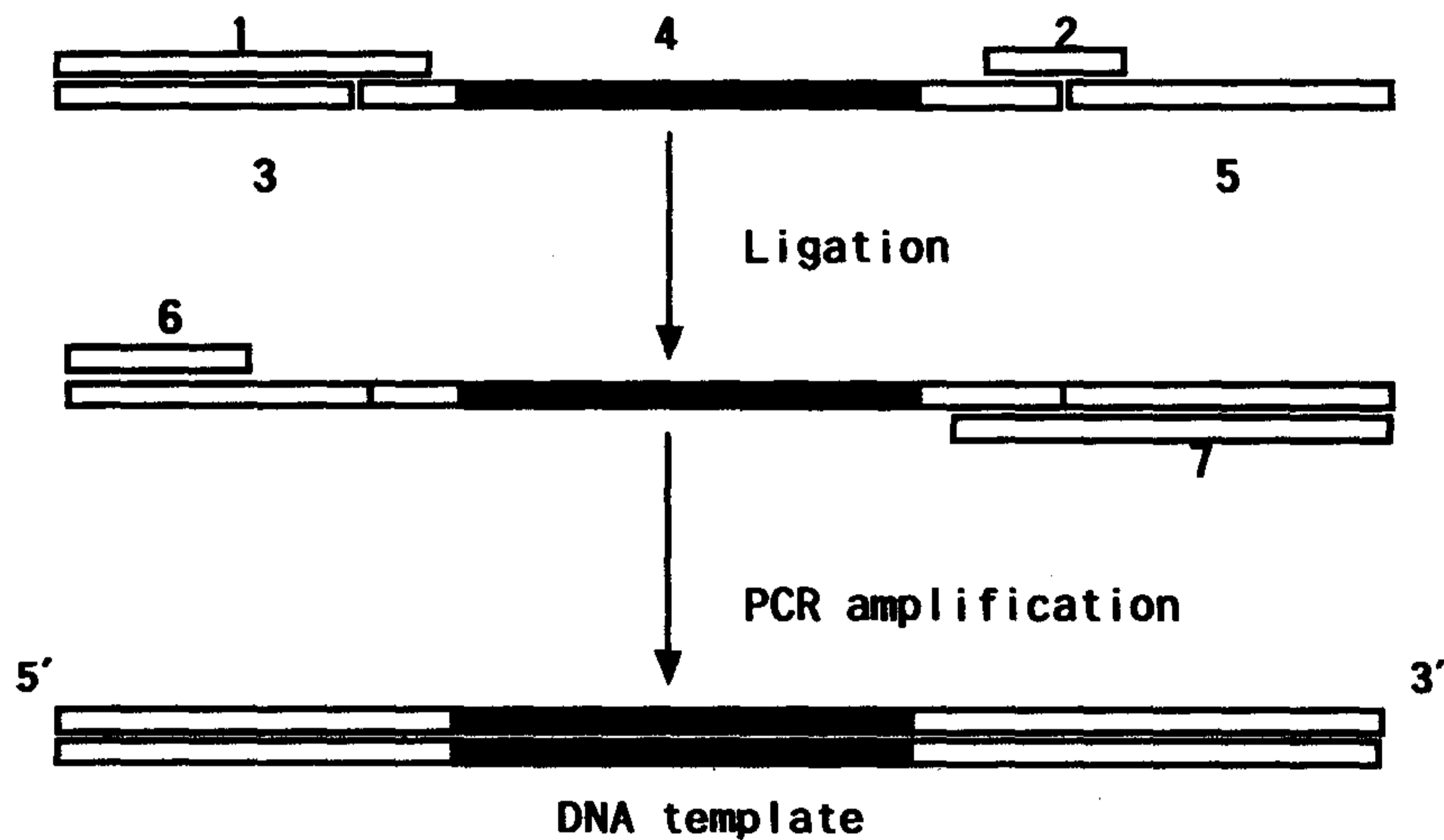
무작위 DNA 집합체는 120 nt의 길이로 이 중 42 nt를 무작위로 택하여 주형 (template)을 합성했다 (Fig. 2). 이 합성은 이미 보고된 바 있는 Schneider 등 (1992)의 방법을 변형하여 제조하였다 (18). 120 nt의 주형을 만들기 위하여 먼저 oligonucleotide 3, 4, 및 5를 합성했다. 이들을 순서대로 연결하기 위해서 oligonucleotide 1과 2를 합성하여 T4 DNA ligase로 oligonucleotide 3, 4, 및 5를 연결시키면 120 nt 길이의 단일가닥 DNA가 만들어진다. 단일가닥 DNA를 개시물질 (primer) 6과 7을 이용해서 PCR 반응을 하면 같은 길이의 이중가닥 DNA 주형이 합성된다. 120-mer의 5' 쪽에 시험관내 전사반응을 위해서 T7 promoter 자리를 위치해 두었다. 이들을 무작위 RNA 집합체를 제조하기 위한 무작위 DNA 집합체로 사용하였다. 주형의 구조는 다음과 같다.

T7 Promoter

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCCAACACCACAATTCCAATCAAG-

(N)₄₂-ATCTATGAAAGAATTTTATATCTCTATTGAAAC-3'

무작위 RNA 집합체는 무작위 DNA 집합체를 주형으로 37°C에서 T7 RNA 중합효소로 2-4 시간 동안 중합반응으로 얻었다 (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 0.4 mM spermidine, 0.1 mg/ml As-BAS, 10 mM DTT, 2 mM rNTP, 50U T7 RNA polymerase, 40U rRNasin). 반응 후 1U RNase-free DNase I을 넣고 15 분간 더 반응시켜서 DNA를 제거시켰다. 이것을 phenol/chloroform (25:24)으로 추출후 정제하여 -70°C에 보관했다.



- 1 : 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCCAACACCACAATCCAATCAAG-3'
- 2 : 5'-ATCTATAGGGGAATTTTATATCTC-3'
- 3 : 5'-GAATTGTGGTGTGGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'
- 4 : 5'-TTTCATAGAT-N42-CTTGATTG-3'
- 5 : 5'-GTTTCAATAGAGATATAAAATTC-3'
- 6 : 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCC-3'
- 7 : 5'-GTTTCAATAGAGATATAAAATTCCTTCATAG-3'

Fig. 2. Template construction.

2. MBP-C5 단백질.

먼저 C5 단백질의 유전자 (*rnpA*)가 있는 pKKRNP23 벡터에서 개시물질 A와 B를 이용한 PCR 반응으로 *rnpA* 유전자를 증폭했다 (19). 이 증폭된 DNA

개시물질 A : 5'-GCTCTAGAATGGTTAAACTGGCATTCC-3',

개시물질 B : 5'-CGGGATCCTCAGGACCCGCGAG-3'

절편을 *Bam*HI과 *Xba*I으로 처리하고, pBluescript SK+ 벡터에 클로닝하였다. 새 벡터에 클로닝된 *rnpA* 유전자 절편을 *Xba*I과 *Pst*I으로 잘라내어 MBP 단백질의 유전자가 들어있는 pMAL-c2 벡터 (New England Biolabs, Inc)에 다시 클로닝하였다. 이렇게 만들어진 벡터를 pMcc5로 명명하였다.

pMcc5 벡터를 가진 세포 JM109를 밤새 키워 새로운 LB 배양배지에 1/100로 희석한다. 세포가 OD₆₀₀ = 0.4-0.6 정도 자라면 1mM IPTG로 MBP-C5 단백질을 유도시킨다. 유도후 4°C에서 10 분간 4,000×g에서 원심분리기로 세포를 모은다. 모은 세포 덩어리를 관-완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF)에 희석시킨다. 초음파 세포파열 방법으로 세포를 깨고 4°C에서 30 분간 9,000×g에서 다시 원심분리하여 깨진 세포 덩어리는 버리고 수용액만 회수한다. 이 수용액의 5 배의 새로운 관-완충용액으로 희석하고 수용액을 아밀로즈 관 (amylose column)에 천천히 부어 MBP-C5 단백질을 아밀로즈 관에 결합시킨다. 이 관을 과량의 관-완충용액으로 씻어낸 후 10 mM 말토스 (maltose)가 첨가된 관-완충용액으로 MBP-C5 단백질을 아밀로즈 관에서 떼어낸다. 분리된 단백질은 다시 모아서 새로운 관-완충용액에서 투석하였고, 10% polyacrylamide-SDS gel에서 확인하였다. 단백질의 농도는 Lowry 방법으로 측정하였고, -70°C에서 보관했다.

3. RNase P 활성.

절단반응은 다음처럼 37°C에서 15 분 동안 두 경우로 나누어 실험했다. RNase P 완전효소의 경우 완충용액 A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 0.01% NP-40)에서 반응시켰고, M1 RNA만의 반응에서는 완충용액 B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NH₄Cl, 100 mM MgCl₂, 5% PEG, 0.01% NP-40)에서 반응시켰다 (6). 효소를 완충용액상에서 기질없이 37°C에서 5 분간 먼저 두었다가 그 다음 기질을 넣고 반응을 시켰다. M1 RNA는 *rnpB* (M1 RNA의 유전자)가 클로닝되어있는 pGer3 벡터를 제한 효소 *FokI*으로 자른 후 SP6 RNA 중합효소로 시험관내 전사반응하여 만들었다. 합성한 M1 RNA는 6% polyacrylamide/7M urea gel에서 분리한 다음 phenol/chloroform등으로 정제했다. 반응의 기질은 대장균 tRNA^{Phe} 전구체를 사용했다. tRNA 전구체가 있는 pHW2CCA 벡터를 *BstNI*으로 절단한 다음 [α -³²P] CTP 존재하에서 SP6 RNA 중합효소에 의한 시험관내 전사반응으로 tRNA 전구체를 합성했다 (20). 반응 후 생성물은 8% polyacrylamide/7M urea gel에서 분리하여 자체방사선기록법 (autoradiography)으로 확인했다.

생체내에서의 활성을 관찰하기 위해서 온도 감수성 세포인 A49를 pMcc5 벡터로 형질전환시켜서 30°C와 43°C에서 각각 성장을 조사했다(21). 동시에 pMAL-c2, pLM1 (*rnpB* 유전자 보유)와 pGEM3를 이용해서 같이 조사했다.

4. 시험관내 선택법.

무작위 RNA 집합체는 약 10¹³-10¹⁴ 개의 무작위 DNA 서열이 존재하는 3 ug의 주형으로부터 T7 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 전사반응으로 합성하고 정제했다. MBP-C5 단백질은 10 ug의 아밀로즈 수지에 미리 결합시켰다. 약 30 ug의 무작위 RNA 집합체를 100 ul의 결합용액 (20 mM HEPES-KCl, pH 8.0, 400 mM NH₄OAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.01% NP-40, 5% glycerol)상에

서 아밀로즈 수지에 결합시킨 MBP-C5 단백질와 섞어서 상온에서 1 시간 동안 방치했다. 단백질에 결합하지 않는 RNA는 1.5 ml의 결합용액으로 씻어내어 제거시켰다. RNA가 결합된 단백질은 10 mM 말토스가 첨가된 결합용액으로 수지에서 분리시켜고, phenol/chloroform 추출 후 에탄올 침전으로 회수했다. 회수한 RNA aptamer는 9 ul의 물에 녹이고 1 ul의 50 uM 개시물질 7 (RNA aptamer의 3'쪽 개시물질)을 넣고 90°C에서 2 분간 가열 후 즉시 42°C에서 30 분간 방치하여 RNA-DNA 결합 분자를 형성시켰다. 여기에 6 ul의 10×역전사 중합효소 완충용액, 40 U의 RNase inhibitor, 4 ul의 2.5 mM dNTP, 8 U의 AMV 역전사 중합효소를 넣어 총 30 ul로 42°C에서 2 시간 반응시켰다. 그 후 75°C에서 10 분간 가열하여 역전사 중합효소의 활성을 제거했다. 반응물을 PCR 용기에 옮겨담고 10 ul의 10×PCR 완충용액, 1 ul의 50 uM 개시물질 1과 1 ul의 50 uM 개시물질 6 (RNA aptamer의 5'쪽 개시물질), 4 ul의 25 mM dNTP, 1 U의 Taq DNA 중합효소를 추가해서 총 100 ul의 PCR 증폭 반응을 했다. 증폭된 DNA를 5% polyacrylamide gel로 정제한 후 시험관내 전사반응으로 다시 RNA 집합체를 합성했다. 이렇게 얻은 RNA 집합체는 두 번째 반복 실험에 동일한 방법으로 사용했다. 이상의 시험관내 선택과정을 같은 방법으로 15 회 반복했다. 시험관내 선택과정의 효율을 높이기 위해서 5 회 이상부터는 RNA-단백질 복합체의 형성 시간을 점점 줄여나갔다.

시험관내 선택으로 15 회까지 얻은 DNA 집합체는 개시물질 8과 9를 이용하여 다시 PCR 증폭 반응을 하였다. 이 증폭된 DNA 집합체를 제한 효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 후 pUC9 벡터에 모두 클로닝했다. 이들은 sequenase version 2.0 (United States Biochemical Cooperation)으로 DNA 서열 결정법으로 확인하였다. 약 100 개의 aptamers의 서열을 DNA 서열로 구분지었다.

개시물질 8 : 5'-CCGGATCCGTTTCAATAGAGATATAAAAATTC-3',

개시물질 9 : 5'-CCGAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAG-3'

5. MBP-C5 단백질 대한 RNA aptamers의 결합능력 분석.

얻어진 RNA aptamers의 MBP-C5 단백질에 대한 결합능력은 gel retardation 실험을 통하여 조사하였다. 조사한 RNA는 무작위 RNA 집합체, 5번 및 10번째 선별된 집합체와 15번째 선별된 각 RNA aptamer이다. 무작위 RNA 집합체, 5번째 및 10번째 집합체는 단백질에 대한 결합능력을 gel상에서 확인했고, 15번째 선별된 각 aptamer들에 대해서는 해리상수를 구하였다. RNA 분자의 5'-말단을 Alkaline phosphatase로 dephosphorylation시킨 후 각 RNA aptamer의 5'-말단에 polynucleotide kinase를 사용해서 [γ -³²P] ATP로 표지했다. 표지된 aptamer는 90°C에서 2분간 가열한 다음 37°C에서 30분간 방치하여 RNA 구조를 복귀 (renaturation)시켰다. 이 RNA 분자를 MBP-C5 단백질과 섞어 실온에서 20분간 방치했다. 단백질에 결합한 RNA와 결합하지 못한 RNA는 5% nondenaturing polyacrylamide gel 상에서 분리한 다음 자체방사선기록법으로 구분했다. 선별된 최종의 aptamers에 대해서는 Phosphorimager로 방사능을 정량하여 해리상수 (dissociation constant, K_d)를 구했다. 선별된 RNA aptamers를 MBP-C5 단백질로 이루어진 RNase P 반응에 첨가시켜서 tRNA^{Phe} 전구체의 절단반응을 관찰했다. 각 RNA aptamer의 농도를 증가시켜 RNase P 절단반응의 저해정도를 선별된 aptamer와 C5 단백질간의 결합세기와 연관시켰다. 선별된 RNA aptamers는 일차적 서열에서의 유사성을 조사했고, 이들의 이차 구조는 에너지 최적화를 통한 프로그램을 이용해서 예측했다 (22).

제 3 절 결과

1. MBP-C5 단백질의 제조.

PCR 증폭 반응을 이용해서 C5 단백질의 유전자, *mpA*, 를 말토스-결합 단백질을 발현할수 있는 pMAL-c2 벡터에 클로닝했다. *mpA* 유전자는 말토스-결합 단백질의 유전자, *malE*, 의 3'-말단에 연결시켰다. 이 벡터는 P_{tac} promoter에 의해서 발현되는 데 약 0.3-1.0 mM IPTG의 양으로 2 시간정도 유도하면 충분한 양의 단백질을 얻을 수 있다. 이 단백질은 아밀로즈 관을 이용한 단 한 번의 크로마토그래피로도 95% 이상 고순도의 단백질을 정제할 수 있었다. RNase P 단백질은 아주 염기성이 강하기에 일반적 완충용액상에서 정제하기란 매우 어렵다 (23). 그래서 정제된 단백질은 7 M urea 상태에서 완전히 변성된 상태로 유지시킨다. 따라서 이렇게 정제된 C5 단백질을 본 연구에서 요구하는 정확한 삼차 구조를 취한 리간드로서 이용하기에 적합치 못하다. MBP-C5 단백질의 경우는 정제과정에서 사용한 완충용액 (재료 및 방법)만으로도 충분히 용해도가 좋은 단백질을 얻을 수 있었다. 이것은 약 3 배 크기의 용해도가 좋은 MBP 단백질의 성질이 크게 작용하였기 때문이다. 최근 C5 단백질의 N-말단에 Hig-tag을 연결한 융합 단백질의 제조가 보고되었는데, 이 융합 단백질도 상당히 높은 용해도를 보였다고 한다 (24). 따라서 MBP-C5 단백질은 보통의 완충용액에서도 좋은 용해도를 가지며, 융합된 C5 단백질이 제대로 된 삼차 단백질 구조를 형성하고 있기에 시험관내에서의 리간드로 사용하기에 적합하다.

2. MBP-C5 단백질의 활성화.

MBP-C5 단백질의 활성화는 생체내에서와 시험관내에서의 두 경우로 나누어서 확인했다. 정제된 MBP-C5 단백질의 활성화는 시험관내 전사반응으로 얻은 M1 RNA와 함께 RNase P 반응을 통해서 증명했다 (Fig. 3). 반응은 기존의

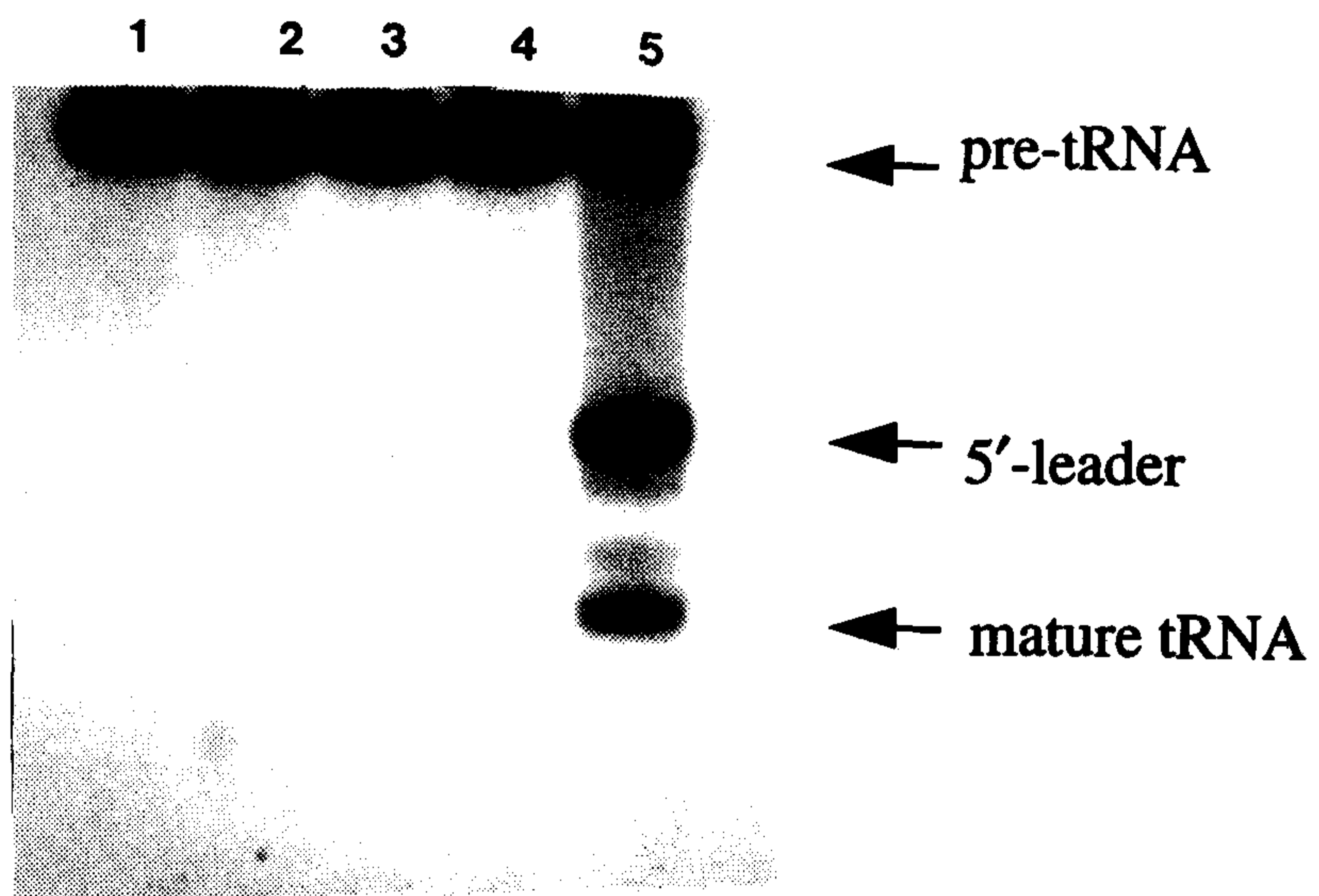


Fig. 3. RNase P reaction. The reaction conditions are shown in the text. Lane 1, substrate only; lane 2, M1 RNA plus MBP protein; lane 3, MBP-C5 protein; lane 4, M1 RNA in low ionic strength buffer; lane 5, M1 RNA plus MBP-C5 protein.

RNase P 반응에서와 같은 반응조건을 채택했다. 효소의 기질은 시험관내 전사 반응으로 표지된 대장균 tRNA^{Phe} 전구체를 사용하였다. 이 전구체는 총 180 nt의 길이를 가지며 76 nt의 성숙한 tRNA의 길이를 제외한 나머지는 104 nt로 5'-말단 조각을 이룬다 (20). RNase P 반응은 낮은 이온세기의 용액 (완충용액 A)에서는 M1 RNA와 C5 단백질을 모두 필요로 한다 (6). 완충용액 A에서 MBP-C5 단백질과 M1 RNA가 각각 혼자서 있으면 반응이 진행되지 않았다. 그러나 이들이 복합체를 형성하면 RNase P 효소활성을 나타내었다 (Fig. 3, lane 5). 한편 반응에 사용한 M1 RNA는 혼자 높은 이온세기의 용액 (완충용액 B)에서 tRNA^{Phe} 전구체를 잘 절단했고 (자료 생략), 완충용액 A에서는 반응하지 못했다 (Fig. 3, lane 4). MBP-C5 단백질은 기존의 C5 단백질의 역할을 잘 대체하고 있다. 대조실험으로 MBP 단백질을 M1 RNA와 완충용액 A에서 반응시키면 절단 반응은 일어나지 않았다 (Fig 3, lane 2). 즉 RNase P 완전효소의 반응은 MBP 단백질이 아닌 C5 단백질의 작용으로 이루어진 것이다. 이것은 정제된 MBP-C5 단백질의 C5 단백질 부분이 정상적 구조를 형성하고 제역할을 수행한다는 사실을 증명해준다.

한편, 세포내에서의 MBP-C5 단백질의 활성을 조사하기 위하여 *mnpA* 유전자가 클로닝되어있는 pMcc5 벡터를 *mnpA49* 돌연변이를 가진 온도 감수성 세포 A49에 형질전환 시켰다 (Table 1). 이 A49 세포는 30°C의 온도에서는 성장하지만 42°C에서는 성장하지 못한다. 이것은 RNase P의 구성 성분중 하나인 C5 단백질의 유전자 *mnpA* 가운데 국부 돌연변이 (point mutation)가 생겨서 이 유전자로부터 발현한 단백질은 온도에 민감한 성질을 띠기 때문이라고 알려져 있다 (25). 그런데 RNase P의 유전자 성분 중 하나에 의해서 이 세포 A49가 형질전환되면 이런 온도 감수성의 표현형 (phenotype)이 상실된다 (26). 대조실험으로 pLM1 (27), pMAL-c2와 임의의 pGEM3 (Promega) 벡터에 대해서도 조사했다. 42°C에서 세포의 온도 민감성이 극복된 경우는 pMcc5와 pLM1 벡터가

있는 세포에서 나타났다. 이들은 각각 RNase P의 유전자 (*rnpA*와 *rnpB*)를 가진 경우에 해당한다. 반면 이들 유전자와 무관한 pMAL-c2와 pGEM3 벡터는 이런 현상이 나타나지 않았다. 따라서 MBP-C5 단백질의 발현 벡터 pMcc5가 A49 세포에 존재하면 고온에서의 세포 성장이 지속적으로 유지되었다.

Table 1. Complementation test of the *rnpA49* mutation.

Plasmids	30°C	43°C
pMcc5	+	+
pMAL-c2	+	-
pLM1	+	+
pGEM3	+	-

The pLM1 vector contains the *rnpB* gene of RNase P from *E. coli*. +, grown; -, not grown.

3. 시험관내 선별법.

C5 단백질에 결합하는 RNA aptamers를 얻기 위해서 친화성 크로마토그래피 방법을 이용한 시험관내 선별법을 수행했다. PCR 증폭된 무작위 DNA 집합체를 T7 RNA 중합효소를 이용해서 최초의 무작위 RNA 집합체를 준비했다. 이 RNA 집합체는 $10^{13} - 10^{14}$ 개의 무수한 종류의 유전자형 (genotype)을 포함하기에 시험관내 선별법의 최초 모집단의 갯수로 적당하다. 이 무작위 RNA 집합체를 상온에서 아밀로즈 수지에 붙은 MBP-C5 단백질에 약 1 시간 동안 결합시켰다. 결합에 참여하지 못한 RNA 분자는 과량의 결합용액으로 강하게 씻어내어 제거했다. 그 다음 말토스가 첨가된 결합용액으로 RNA-단백질 복합체를 아밀로즈 수지에서 분리시켰다. 수지에서 떼어낸 RNA 분자는 phenol0/chloroform 등을 통해 정제 하고, AMV-역전사 중합효소로 다시 DNA 분자로

복구시켰다. 선별된 집합체의 양을 증가시키기 위해서 PCR 증폭 반응을 했다. 이런 과정의 순환 실험을 15 회까지 반복해서 결합력이 강한 RNA aptamers를 획득했다.

C5 단백질에 강한 친화력으로 결합하는 RNA 분자를 얻기 위하여 먼저 반응 용기, 아밀로즈 수지, 및 MBP 단백질 부분에 결합할 수 있는 RNA를 제거할 목적으로 미리 무작위 RNA 집합체를 아밀로즈 수지에 결합한 MBP 단백질에 섞었다. 여기서 결합하지 않은 RNA 분자를 분리하고 MBP-C5 단백질에 다시 결합시킴으로서 C5 단백질이외에 결합할 수 있는 RNA 분자들의 가능성을 없앴다. 그리고 RNA-단백질의 복합체 형성시간을 5 회 이상의 선별과정에서부터 점점 감소시켜서 속도론적으로 유리한 분자들만을 선별되게 했다. 이상의 15 회 반복으로 획득한 RNA aptamers를 DNA 분자로 환원시키고, 개시물질 8과 9로 PCR 반응을 통해서 증폭한 후 pUC9 벡터의 제한효소 *HindIII*와 *BamHI* 사이에 클로닝했다.

4. 분석.

선별된 aptamers는 DNA로 변형시키고 dideoxy 방법으로 DNA 서열을 구분했다 (28). 약 100 개의 서열을 읽은 결과 17 개의 서로다른 서열과 이들의 국부 돌연변이가 나타났다 (Fig. 4). 이 중 aptamer W2 서열의 동일 서열은 무려 50 개나 나왔다. 또한 이 서열의 국부 돌연변이도 가장 많이 나왔다. 이의 aptamer W14의 서열이 그 다음으로 국부 돌연변이가 많았다. 이들에 대해 일차 구조에서의 유사서열을 조사했다. 7 개의 모임으로 나누어서 CAAA, GCAG, GTTC, GTTT, GTGCA, GTGCA 와 TCTAG 등의 유사서열을 그림 5에 나타내었다. 그리고 RNA aptamers의 서열을 에너지 최적화에 의한 이차 구조를 예측해보았다 (22). 이들의 이차 구조는 다양한 복잡한 양상을 보였다 (Fig. 6).

W1 : ACATACAGACAAGTCAAACACTACTGACATAAGCGAATTGTGTA7
 W12 : GTGCAGGTTTTGAAGATGTGCCGACTTCTACACCAAACGGCA
 W13 : GTTGATAGTGTTCGTCTAATGAGCACGAGGTGAGCGATTGGC
 W29 : TTGCCTAATGACGGTTTTAACAAAGGACCCCAAAGGTCAACC
 W33 : CTGTCGCAAGCTGCCCTCCGATAGAGGGAAGTGCTCGAGCTT
 W50 : GACTTGTGCAAGAACCAGTCAAAGCCGGGCCGTTAAGCTA
 W65 : ACAACTTGCAGCTTGCAGTATTCGTTTGTGGCAAAGTCTAA
 W77 : CTTAATAGTGACCGCTTAATGGTAACAACCTGTGCAGATTGG
 W85 : ACGGCATGCACGGCTGCAAAGTGCAATCAAAGAGCCTCTGT
 W113 : GCAGCTGCATTGTGCAATTTAAAGAGCTGGGCTAACCAAACA
 W01 : TCATACGGGGCAGGCATTTAAACTCTAAAGGCGAGTTCTAGC
 W02 : GGCAGTACACGTCACGTATTATCTAAATCACACGTTCCGGC

W2 series :

W2 : CGTCCCTTCGCAACCCTTTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W34 : CGTCCCTTCGCAATCCTTTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W57 : CGTCCCTTTGCAACCCTTTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W58 : CGTCCCTTCGCAACCCTTTAAGACTTGGGACCCCGCTCTT
 W63 : CGTCCCTTCGCAACCCTTTAAGACTTGGGACCCTGCTCCT
 W73 : CGTCCCTTCGCAACCCCTTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W74 : CGTCCCTTCGCAACCCTCTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W111 : CGTTCCTTTGCAACCCTTTAAGACTTGGGACCCTGCTCTT
 W06 : CATCCCTTCGCAACCCTTTAAGACTTGGACCAAGCTCTT

W14 series :

W14 : CGGAATGAATTTTATAAACAGGTGTTTGGCGGCAGTTCCGCC
 W67 : CGGAATGAATTTTATAAACAGGTGTTTGGCGGCAGTTCCGCC
 W107 : CGGAATGAATTTTATAAACAGGTGTGTGGCGGCACGTTCCGCC
 W108 : CGGAATGAATTTTATAAACAGGTGTGTGGCGGCAGTTCCGCC
 W04 : CGGAATGAATTTTATAAACAGGTGTTTGGCGGCAGTTCCGCC

W84 series :

W84 : GGGCATAACAAAATGGCTTGTCTTAATTTTCGCCCGTTCCCTT
 W99 : GGGCATAACAAAAGGCTTGTCTTAATTTTCGCCCGTTCCCTT
 W05 : GGGGCATAACAAAATGGCTTGTCTTAATTTTCGCCCGTTCCCTT

W51 series :

W51 : GTGGTTCGGCTTCGAAAAGAAACGAGCGACTACCATGTCGCT
 W03 : TTGTACGCTTCGAAAAGAAATGATGCCAGCCTACAAGTGAGC

W89 series :

W89 : GGGTTGTGCCAAACCTGTCGTTTAAACAGCAGTTCAGCTCG
 W96 : GGGTCGTGCCAAACCTGTCGTTTAAACAGCAGTTCAGCTCG

Fig. 4. Sequences of C5 protein-binding RNAs. The sequences of the random region of the aptamer are only shown.

[CAAA] W12 : gtcaggTTTTgaagatgtgccgacttctacAAAacggCa
W65 : acaacttgcagcttgcagttatcgTTTgtGgCAAAagtCtaa
W1 : acatacagaCaaGtCAAActaCtgacataagcgaattgtgta
W50 : gacttgtgcaagaacCcaGtCAAAGcCgggccgTTaagcta
W84 : gggCatAaCAAAaggCttgtccttaatttcgccgTTccctt
W29 : ttgcctaagtgacggTTtAaCAAAggaCcccaaaggtcaacc
W89 : gggTTgtGcCAAAcctgtcgtttaaacagcagttcagctcg
W85 : acggcatgcacggctgCAAAgtGCaatcaaaagagcctctgt
W113: gcagctgcattgtgcaatttaaagagctgggctaAcCAAca

[GCAG] W12 : gtGCAGTTTgaagatgtgccgacttctacaccaaacggca
W01 : tcatacgggGCAGgcatttaaactctaaaggcagttctagc
W02 : gGCAGtacacgtcacgtattatctaaatcacacgttccggc
W113: GCAGctgcattgtgcaatttaaagagctgggctaaccaaca
W77 : cttaatagtgaccgcttaatggtaacaacctGTGCAgattgg
W89 : gggTTgtgccaacacctgtcgtttaaacaGCAGTTcagctcg
W79 : cggaaTgaattttataacaggtgtttggcgGCAGTTccgcc
W65 : acaacttGCAGcTTgcagttatcgTTTgtggcaaaagtctaa

[GTGCA] W85 : acggcatgcacggctgcaaaGTGCAatcaaaagagcctctgt
W113 : gcagctgcattGTGCAatttaaagagctgggctaaccaaca
W50 : gacttGTGCAagaaccagtcaaaagccgggccgTTaagcta
W77 : cttaatagtgaccgcttaatggtaacaacctGTGCAgattgg
W12 : GTGCAggTTTTgaagatgtgccgacttctacaccaaacggca

[GTTC] W79 : cggaaTgaattttataacaggtgtttggcggcaGTTcggc
W01 : tcatacggggcaggcatttaaactctaaaggcgaGTTctagc
W02 : ggcagtacacgtcacgtattatctaaatcacacGTTcggc
W84 : gggcataacaaatggcttgccttaatttcgccGTTccctt
W89 : gggTTgtgccaacacctgtcgtttaaacagcaGTTcagctcg
W51 : gtgGTTcggcttcgaaaagaaacgagcactaccatgtcgt
W13 : gttgatagtGTTcgtctaatgagcacaggtgagcgattggc

[GTGCA] W85 : acggcatgcacggctgcaaaGTGCAatcaaaagagcctctgt
W113 : gcagctgcattGTGCAatttaaagagctgggctaaccaaca
W50 : gacttGTGCAagaaccagtcaaaagccgggccgTTaagcta
W77 : cttaatagtgaccgcttaatggtaacaacctGTGCAgattgg
W12 : GTGCAggTTTTgaagatgtgccgacttctacaccaaacggca
W33 : ctgtcgcaagctgccctccgatagagggaaGTGCTcagctt

[GTTT] W12 : gtcagGTTTgaagatgtgccgacttctacaccaaacggca
W29 : ttgcctaagtgacgGTTTtaacaaaggaccccaaaggtcaacc
W65 : acaacttgcagcttgcagttatcGTTTgtggcaaaagtctaa
W79 : cggaaTgaattttataacaggtGTTTggcggcagttccgcc
W89 : gggTTgtgccaacacctgtcGTTTaaacagcagttcagctcg

[TCTAA] W13 : gttgatagtgttcgTCTAAtgagcacgaggtgagcgattggc
W01 : tcatacggggcaggcatttaaactCTAAaggcagttctagc
W02 : ggcagtacacgtcacgtattaTCTAAatcacacgttccggc
W12 : gtcaggtTTTTgaagatgtgccgactTCTAActacaccaaacggca
W65 : acaacttgcagcttgcagttatcgTTTgtggcaaaagTCTAA

Fig. 5. Consensus sequences of the RNA aptamers.

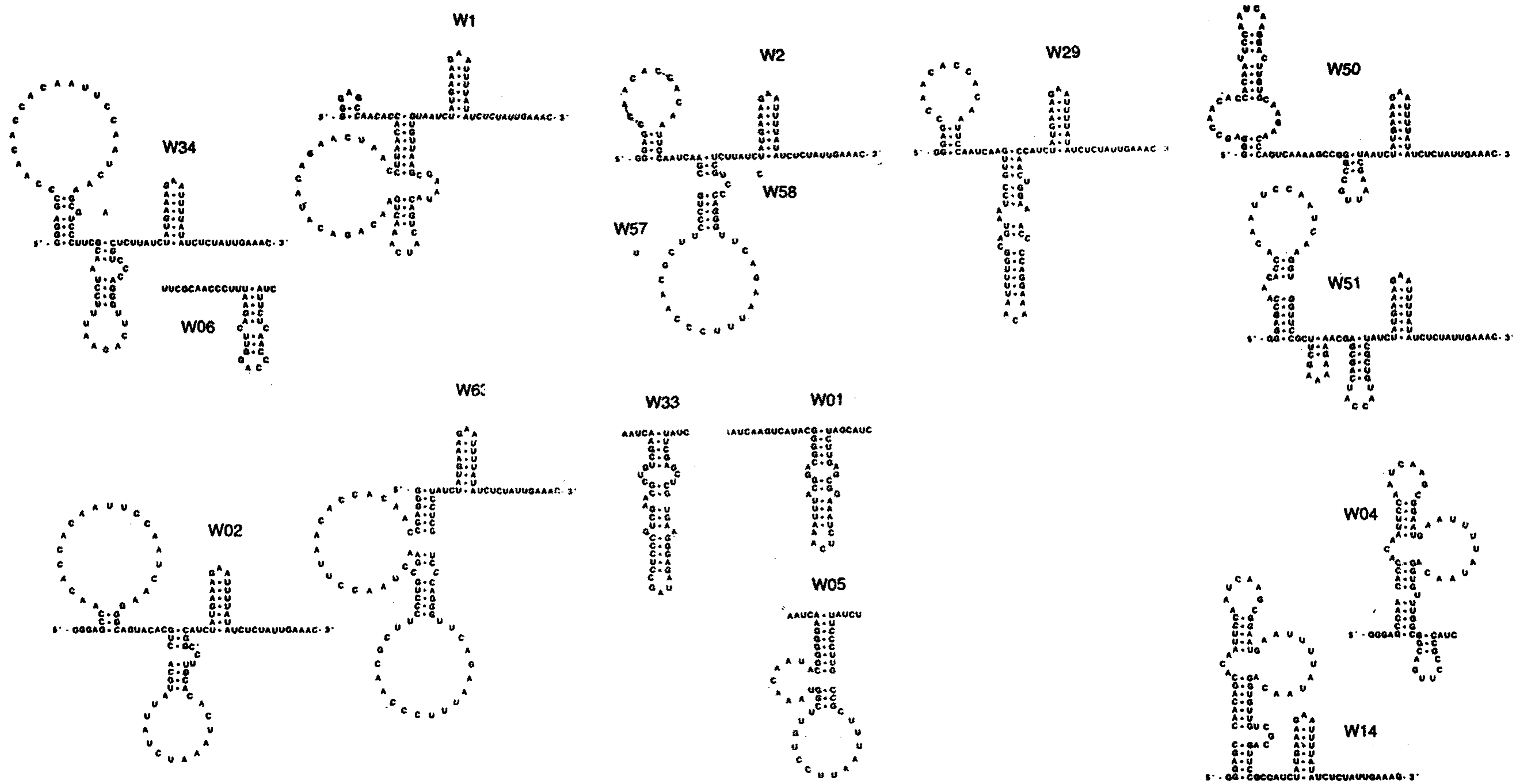


Figure 6. Possible secondary structures of RNA aptamers.

선별 실험의 효율성을 보기 위해서 gel retardation 실험으로 무작위 RNA 집합체, 5 번째와 10 번째 선별된 집합체의 MBP-C5 단백질에 대한 친화력을 시험해 보았다 (Fig. 7). 선별 횟수가 증가될수록 RNA 집합체의 RNA-단백질 복합체의 형성 비율이 점점 증가되었다. 무작위 RNA 집합체의 경우 복합체의 형성이 거의 관찰되지 않는다. 이 집합체는 과량의 단백질을 사용해야만 약간의 복합체를 형성할 수 있었다. 5 번째로 선별된 집합체는 단백질에 대한 결합력이 많이 향상되었다. 10 번째 집합체는 소량의 단백질만으로도 복합체를 형성할 수 있는 점으로 보아 단백질에 대한 친화력이 상당히 증가되었다는 것을 판단할 수 있다. 그래서 이들에 대한 정량적 자료를 얻기 위해서 gel retardation 실험을 통한 RNA-단백질간 해리상수를 구하였다 (Table 2). 이들 값에서 선별된 RNA aptamers는 무작위 RNA 집합체보다 약 10 - 30 배가량의 차이를 보인다. aptamer W12의 MBP-C5 단백질에 대한 결합 변화를 gel retardation 방법으로 나타내었다 (Fig. 8). 이들간의 복합체는 두 개의 다른 이동력을 지닌 RNA-단백질 복합체를 형성하였다. 이 중 aptamer W2는 무작위 RNA 집합체보다 약 29 배 친화력의 증가를 나타내었다 ($K_d \sim 2.0 \times 10^{-9} M$). 따라서 선별된 RNA aptamers는 모두 C5 단백질에 대한 강한 결합력을 가졌다. 가장 강한 결합력을 가진 aptamer W2의 경우 M1 RNA ($K_d \sim 0.4 \times 10^{-9} M$)보다는 상대적으로 큰 값을 가졌다 (29).

RNase P 반응에서 선별된 RNA aptamer를 첨가하여 이들이 반응을 저해하는 정도를 관찰하였다 (Table 2). 이것은 RNase P 반응을 약 50% 정도 저해하는 RNA aptamer의 농도를 비교해보는 것으로 조사했다. aptamer W2는 이들 중 가장 크게 반응에 영향을 주었다 ($IC_{50} \sim 9.9 \times 10^{-7} M$). 이것은 앞의 결과와 함께 선별된 RNA 분자중 aptamer W2가 C5 단백질에 대한 결합력이 가장 강하다는 것을 시사해준다. aptamer W14의 경우 그림 9에 나타나있다.

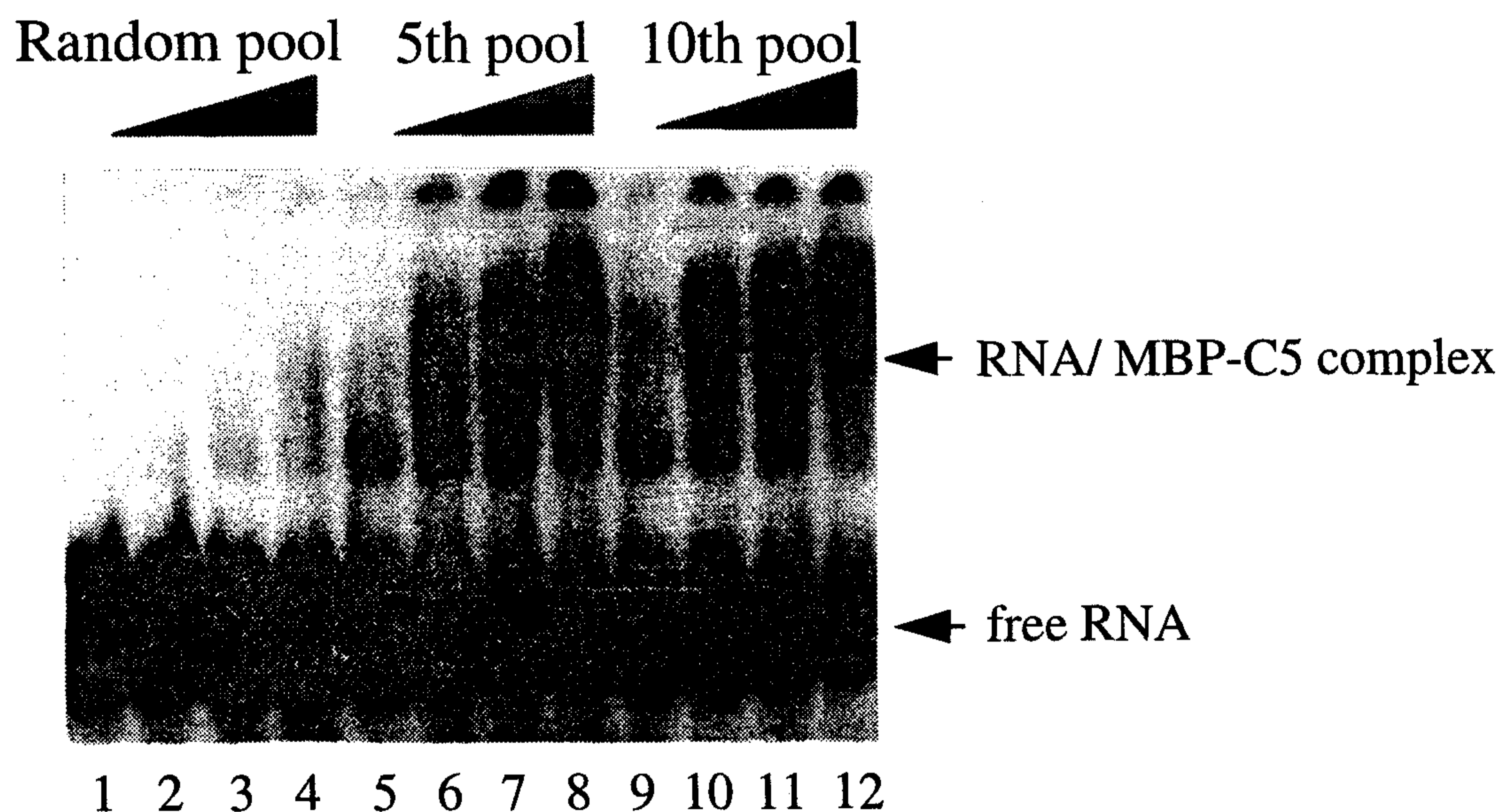


Fig. 7. Binding affinity of selected RNA pools. RNA aptamer was incubated with the MBP-C5 protein for 30 min at 37°C in 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 10 mM Mg(OAc)₂, 500 mM NH₄(OAc), 0.01% NP-40, 5% glycerol. The MBP-C5 protein is added as : Lanes 1, 5, and 9, 0.53 nM; lanes 2, 6, and 10, 2.63 nM; lanes 3, 7, and 11 7.88 nM; lanes 4, 8, and 12, 15.75 nM.

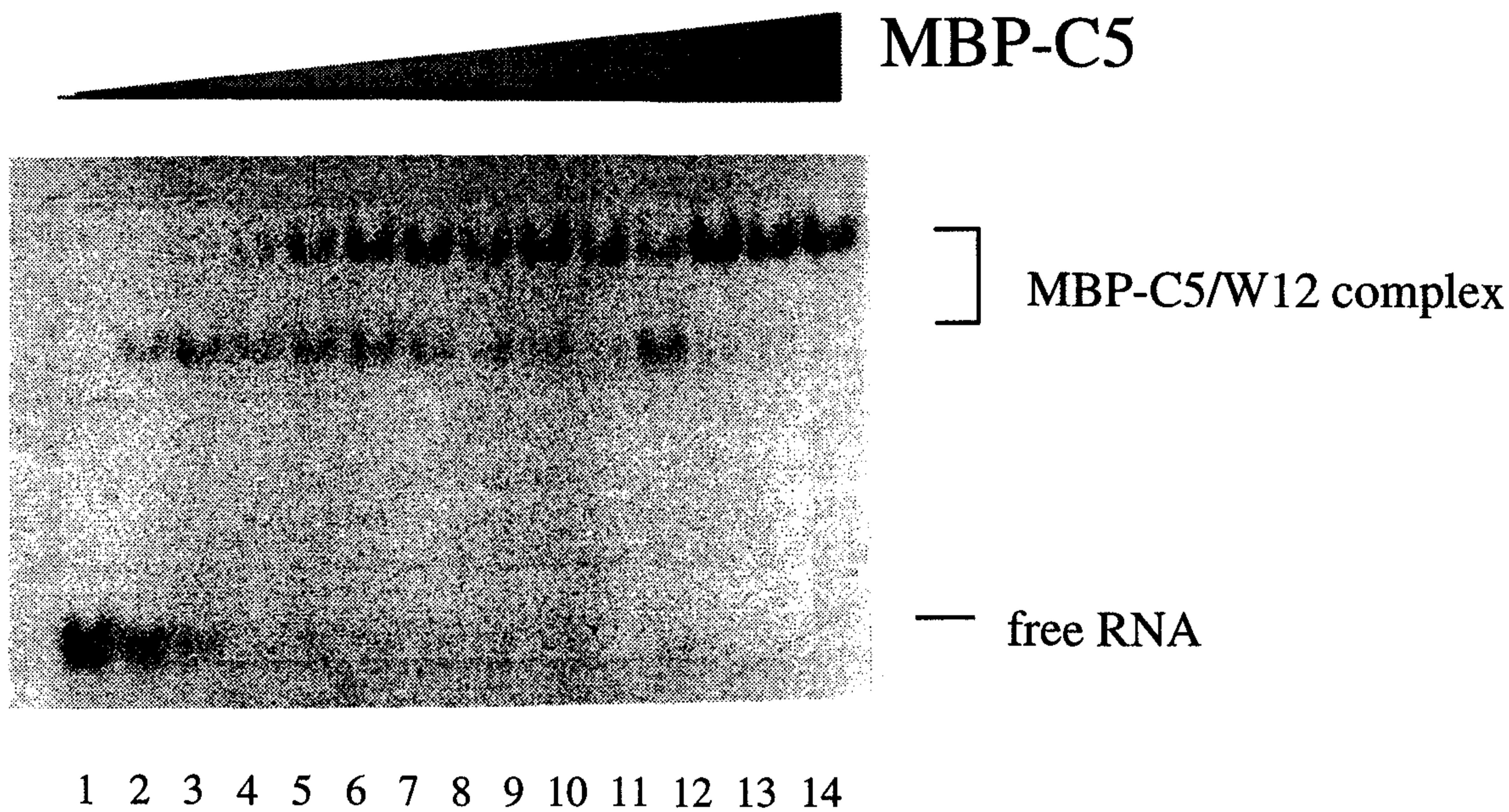


Fig. 8. Binding of W12 RNA with MBP-C5 protein. RNAs were folded in the binding buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 10 mM Mg(OAc)₂, 500 mM NH₄(OAc), 0.01% NP-40, 5% glycerol) by preincubation at 70°C for 10 min. The binding assay was initiated by adding the MBP-C5 protein (lane 1, no protein; lane 2, 0.45 nM; lane 3, 0.89 nM; lane 4, 1.34 nM; lane 5, 1.61 nM; lane 6, 1.79 nM; lane 7, 1.96 nM; lane 8, 2.14 nM; lane 9, 2.23 nM; lane 10, 2.32 nM; lane 11, 2.41 nM; lane 12, 2.68 nM; lane 13, 2.86 nM; lane 14, 3.57 nM) to the folded 2.5 nM RNA. After 20 min incubation at room temperature, 10 ul of each reaction mixture was loaded onto a 5% nondenaturing polyacrylamide gel.

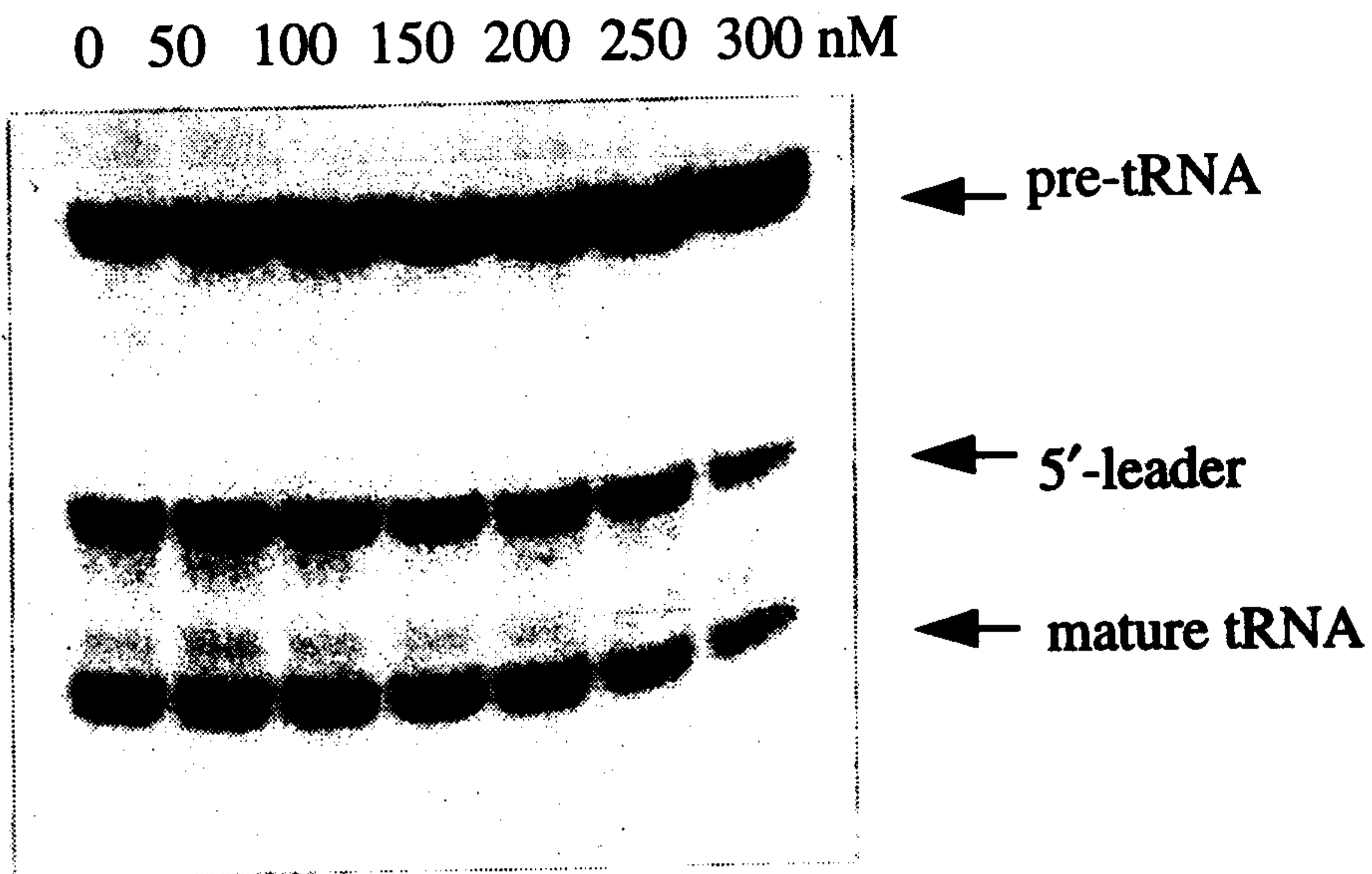


Fig. 9. Inhibition of the RNase P reaction by W14 RNA. M1 RNA (1 nM) and the indicated concentration of W14 RNA were preincubated in the presence of 5 nM MBP-C5 protein for 5 min at 37°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂. The reaction was performed by the addition of 5nM uniformly-labeled tRNAPhe precursor. The reaction products after 20 min were analyzed on a 10% (w/v) polyacrylamide/7M urea gel. Concentrations required for 50% inhibition of the RNase P reaction were calculated using a phosphorimager (Molecular Dynamics 450S).

Table 2. Dissociation constants of aptamers for C5 protein and aptamer concentrations (IC₅₀) required for 50% inhibition of the RNase P reaction.

Aptamers	Kd ($\times 10^{-9}$ M)	IC ₅₀ ($\times 10^{-7}$ M)
Random	58	n.d.
W1	n.d.	2.8
W2	2.0	0.99
W12	4.5	n.d.
W13	n.d.	2.0
W14	n.d.	1.7
W34	3.0	n.d.
W50	2.5	2.6
W58	n.d.	1.3

n.d., not determined.

제 4 절 고찰

RNA-결합 단백질의 RNA 분자의 인식은 유전자의 전사과정이나 리보솜의 구성등 여러 면에서 중요한 역할을 나타낸다 (16). 이들 결합은 대부분의 DNA-결합 단백질이 특정 DNA 상의 서열을 인식하는 반면 훨씬 복잡·다양한 현상으로 일어난다. 무엇보다 RNA 분자는 같은 핵산의 일종인 DNA와는 달리 구조적으로 다양한 가능성을 취할 수 있다는 점이 중요하다. RNA는 A 형의 이중가닥을 형성하며 길고 짧은 길이의 단일가닥도 존재 가능하다. A 형의 이중가닥은 B 형의 구조보다 좁고 깊은 major groove를 가지고, minor groove는 상대적으로 넓고 얇아 다른 분자와의 상호작용이 다른 현상으로 나타날 가능성이

높다. 이중가닥은 단순한 염기쌍을 이루기보다 bulge나 internal loop등의 구조로 많은 변형이 생긴다. 예를 들어 UIA 단백질이나 HIV tat 단백질은 bulge 구조를 인식하고, TFIIIA나 HIV rev 단백질은 internal loop 구조를 인식한다. 특히 hairpin, pseudoknot, 삼중가닥등의 구조는 RNA 분자의 삼 차원적 구조형성에 중요한 인자로 관여한다.

RNA-결합 단백질의 일종인 C5 단백질은 대장균 RNase P 효소의 구성 성분으로 리보자임인 M1 RNA와 복합체를 이루어 효소작용에 관여하는 보조인자이다. RNase P 완전효소는 RNA와 단백질이 1:1로 이루어져있다. 이 복합체는 아주 강한 결합 ($K_d \sim 0.4 \times 10^{-9} M$)으로 형성되어있어서 높은 이온세기의 완충용액에서도 여전히 복합체를 형성한다 (30). C5 단백질에 결합하는 M1 RNA의 영역은 효소와 화학물에 의해서 조사되었다 (23, 29). C5 단백질은 M1 RNA의 삼 차원적 구조 변형에 직·간접적으로 참여한다. 하지만 이 RNA-단백질간의 구조 인식은 현재까지 정확히 알려져있지 않다.

단백질의 RNA 구조 인식은 다양한 방법 (일부구조의 삭제·치환, 돌연변이, 광친화성 화합물의 이용, gel mobility shift assay 등)으로 연구되고 있다. 이 중 시험관내 선별법은 그 활용 범위가 넓고 얻어지는 정보의 다양성 및 우수성으로 최근 여러 분야에서 활발히 응용되고 있다. 무수한 갯수의 모집단에서 어떤 리간드에 특이적으로 결합 가능한 분자들을 선별해내면 그들 선별된 분자의 특성으로부터 특정 리간드에 대한 분자인식 방식을 추론할 수 있게 된다. 본 연구에서도 이런 선별법의 특성을 C5 단백질에 적용했다. 이 단백질이 RNA 분자를 인식하는 양태를 파악함으로써 M1 RNA와의 결합 방식을 이해할 수 있고, RNase P의 구성 성분으로서의 역할을 추적하며, 생체내에서 알려져 있지 않은 가능한 생물학적 기능을 유추할 수 있을 것이다.

1. MBP-C5 단백질.

기존의 RNase P 단백질의 정제과정은 완전히 구조가 변성된 상태로 얻는다 (23, 31). 시험관내 선별법은 정상적 구조의 단백질 상태를 요구하기에 본 연구에서는 새로운 방식의 단백질 제조과정을 개발하였다. MBP 단백질은 용해도가 좋고 정제과정이 용이하여 융합 단백질로 널리 사용되고 있는 단백질중 하나이다 (32). C5 단백질을 MBP 단백질의 C-말단에 융합시킨 MBP-C5 융합 단백질은 이런 성질을 잘 만족시켜 주었다. 정제한 단백질은 95% 이상의 순도로 별도의 추가 과정없이 바로 본 실험에 사용했다. MBP-C5 단백질의 활성은 시험관내 RNase P 반응과 형질전환에 의한 온도감수성 세포인 A49의 표현형 변화로 증명되었다. 융합 단백질에서 MBP 단백질 부분은 C5 단백질의 용해도를 증가시켜 주었으며, C5 단백질이 M1 RNA와 결합하여 RNase P 효소 작용을 하는 데 방해하지 않았다. MBP-C5 단백질의 C5 단백질 부분은 MBP 단백질의 영향을 받아 보통의 완충용액에서도 자신의 삼차원적 구조를 잘 형성하고 있다고 하겠다. MBP-C5 단백질은 정제과정이 용이하면서도 C5 단백질의 성질이 잘 보존되어 있기에 C5 단백질의 성질이나 구조를 연구하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

2. 시험관내 선별 및 RNA aptamers.

C5 단백질은 M1 RNA와 특이하게 결합하여 RNase P 효소를 형성한다. 지금까지 이 단백질 성분과 RNA-단백질 복합체간 상호작용에 대한 이해가 부족했다. MBP-C5 단백질을 이용한 시험관내 선별은 C5 단백질에 결합하는 RNA 분자의 양상을 찾고자 시작했다. 여기서 얻어지는 RNA aptamers는 C5 단백질에 결합하는 새로운 RNA 분자로 기존의 M1 RNA와 비교·분석하여 유사성과 차이점을 밝히면 C5 단백질의 RNA 인식에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

RNA aptamer는 120-mer로 M1 RNA에 비해 약 3 배 정도 작고, 길이의 약 61%가 이미 정해진 서열로 고정되어있다. 시험관내 선별로 약 17 종의 RNA aptamers을 얻었다. 이들의 C5 단백질에 대한 결합력은 해리상수와 RNase P 반응 저해 효과로 확인한 결과 모두 강한 결합력을 지닌 것으로 나타났다. 이들 중 aptamer W2는 가장 결합력이 가장 강한 것으로 나타났다. RNA aptamers는 염기서열에서 CAAA, GCAG, GTTC, GTTT, GTGCA, GTGCA 와 TCTAG의 유사서열을 보였다. 이들 일차 서열이 M1 RNA의 일부 서열과의 연관성은 & 에너지 최적화로 나타난 이차 구조는 복잡했다. 이들은 일단 aptamer내 정해진 서열이 자체적으로 또는 무작위 서열과 염기쌍을 이루는 것으로 분류할 수 있겠다. 이들 서열에 대한 중요성은 구체적 연구가 별도로 진행되어야겠다. 특히 결합력이 강한 aptamer W2를 다시 시험관내 선별법을 실험할 경우 이차적 구조를 예측할수 있고, 보다 더 우수한 aptamers를 얻을 수 있을 것이다.

대장균 RNase P는 tRNA의 전구체이외에도 4.5S RNA나 10Sa RNA 등의 또 다른 기질도 절단한다. 흥미로운 사실은 tRNA의 acceptor stem과 T stem & loop로 이루어진 작은 RNA 분자도 이 효소의 기질이 된다는 점이다 (33). 그리고 이 기질의 변형으로 생긴 외부인식서열 (external guide sequence, EGS)의 발견은 RNase P 효소가 유전자 치료의 치료제로서 그 응용의 길을 가능케 해주었다 (17). 최근 연구된 이런 결과는 기존의 리보자임을 이용한 결과와 유사한 평가를 받았다 (34). RNase P 효소의 경우 생체내에 자연적으로 존재하며 다른 리보자임과는 달리 trans-작용하는 반응으로 효소작용이 진행되기에 관심이 한층 높다.

제 5 절 참고 문헌

1. Smith JD. (1976) *Progress in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* **16**: 25-73.
2. Kirsebom, LA. (1995) *Mol. Microbiol.* **17**: 411-420; Pace NR Brown JW. (1995) *J. Bacteriol.* **177**: 1919-1928.
3. Reed RE, Baer MF, Guerrier-Takada C, Donis-Keller H & Altman S. (1982) *Cell* **30**: 627-636.
4. Hansen FG, Hansen EG & Atlung T. (1985) *Gene* **38**: 85-93.
5. Bothwell ALM, Garber RL & Altman S. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 7709-7716; Komine Y, etc. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9223-9227.
6. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace NR & Altman S. (1983) *Cell* **35**: 849-857.
7. Kole R, Baer MF, Stark BC & Altman S. (1980) *Cell* **19**: 881-887.
8. Guerrier-Takada C & Altman S. (1984) *Science* **233**: 285-286.
9. Altman S, Kirsebom LA & Talbot S. (1993) *FASEB J.* **7**: 7-14; Pace NR & Smith D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 3587-3590.
10. Baer M & Altman S (1985) *Science* **228**: 999-1002; Lawrence N, *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **52**: 325.
11. Reich C, Olsen GJ, Pace B & Pace NR. (1988) *Science* **239**: 178-181.
12. Peck-Miller K & Altman S (1991) *J. Mol. Biol.* **221**: 1-5.
13. Lumelsky N & Altman S (1988) *J. Mol. Biol.* **202**: 443-454.
14. Gopalan V, Talbot SJ & Altman S. (1994) In: Nagai & Mattaj IW (Ed) *RNA-Protein Interactions* (pp 103-126) IRL Press, Oxford.
15. Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 763-797.
16. Draper DE. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 593-620.
17. Li Y, Guerrier-Takada C & Altman S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3185-3189; Guerrier-Takada C, Li Y & Altman S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11115-11119; Yuan Y, Hwang E &

- Altman S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8006-8010; Liu F & Altman S. (1995) *Genes Dev.* **9**: 471-480.
18. Schneider D, Tuerk C & Gold L. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**: 862-869.
19. Choi YN. (1992) M.S. Thesis, KAIST.
20. Kim IY & Lee SY. *Mol & Cell* (1990) **1**: 3-7.
21. Schedl P & Primakoff P. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2091-2095.
22. Zuker M. (1989) *Science* **244**: 48-52.
23. Vioque A, Arnez J & Altman S. (1988) *J. Mol. Biol.* **202**: 835-848.
24. Rivera-León R, Green CJ & Vold BS. (1995) *J. Bacteriol.* **177**: 2564-2566.
25. Baer M, Wesolowski D & Altman S (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 6862-6866.
26. Motamedi H, Lee K, Nichols L & Schmidt FJ. (1982) *J. Mol. Biol.* **162**: 535-550.
27. Lee SJ, Jung YH, Park CU & Lee Y (1991) *Mol. & Cell* **1**: 415-420.
28. Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
29. Talbot SJ & Altman S. (1993) *Biochemistry* **33**: 1399-1405.
30. Kole R & Altman S. (1981) *Biochemistry* **20**: 1902-1906.
31. Gardiner DJ, Marsh TL & Pace NR. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 5415-5419.
32. Guan Cd, Li P, Riggs P & Inouye H. (1988) *Gene* **67**: 21-30.
33. McClain WH, Guerrier-Takada C & Altman S. (1987) *Science* **238**: 527-530.
34. Forster AC & Altman S. (1990) *Science* **249**: 783-786.

제 8 장 혈관유도인자의 활성을 조절하는

DNA aptamer의 선별 및 특성

제 1 절 서 설

시험관 내에서 특정 분자에 결합하는 핵산을 선별하기 위하여 무작위로 합성된 핵산의 집합으로부터 선별과 증폭 과정을 반복하여 자체 내 생활성을 지니거나, 특정 대상 분자에 결합하여 생활성을 조절하는 핵산을 분리하는 실험적 절차를 SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) 라고 한다 (1). SELEX를 통해 선별된 DNA나 RNA는 특정한 2차구조나 염기 배열을 공유하고 있어서 대상 분자에 대한 강력한 결합력을 보이고, 뿐만 아니라 여러가지 세포내 신진대사 조절에 직접적, 혹은 간접적으로 관여할수 있다 (2). 이러한 특정 대상 분자에 결합하는 핵산들을 aptamer라고 일컫는다 (3).

본 연구에서는 신생혈관생성(Angiogenesis)을 유도하는 단백질인 angiogenin에 결합하는 외가닥 DNA를 선별하여, 신생혈관생성을 저해할수 있는 angiogenesis inhibitor를 개발해 내고자 한다. 신생혈관생성은 배성장, 생식, 발달, 상처회복등과 같은 정상적인 과정에서는 잘 조절되면서 일어난다. 그러나 이러한 신생혈관생성이 잘 조절되지 않으면 여러 가지 질병이 발생하게 된다. 악성종양은 자신의 성장을 위해 영양분을 흡수하고 노폐물을 배출하는 통로로서 새로운 모세혈관을 계속적으로 유도하므로, 암의 성장 및 전이는 신생혈관생성에 의존한다. 모세혈관이 관절에 침투하여 연골을 파괴시킬때 생기는 류마티스성 관절염, AIDS 환자에게 자주 나타나는 카포시육종, 그리고 어린아이의 허파에 생기는 혈관종도 신생혈관생성에 기인하는 질병이다. 이외에, 안조직에 생

기는 신생혈관생성은 여러 가지 안질환을 야기 시킨다. 당뇨병환자의 망막에 새로 형성된 모세혈관이 유리질에 침투하여 시력을 저하시키거나 또는 심할 경우 실명케하는 당뇨병성 망막증, 그리고 각막이식 후 비조절된 각막의 신생혈관생성에 의한 부작용등을 예로 들 수 있다 (4-7). 이러한 신생혈관생성을 유도하는 단백질인 angiogenin은 14Kda의 분자량을 지니며 RNA를 분해하는 활성을 가지고 있다고도 알려져 있다 (8). 본 실험에서는 10^{13} 가지의 무작위 핵산집합에서 angiogenin에 강력하게 결합하는 외가닥 DNA를 선별하여 신생혈관생성을 저해할수 있는 약제의 가능성을 가늠해 보고자 한다. 신생혈관생성을 억제하는 약제가 개발된다면 신생혈관생성에 기인하는 여러 질환을 치료하는데에 이용될수 있을 것이다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 올리고뉴클레오티드

SELEX에 사용된 무작위 DNA은 24개 염기길이의 primer 1, 31개 염기길이의 primer 2와 42개의 무작위 영역으로 구성된, 총 120개의 염기를 가진 올리고뉴클레오티드이다. primer 1, 2는 선별 과정 중의 PCR을 이용한 DNA pool의 증폭을 위해 사용되었다. 이중 primer 2의 5' 말단에는 외가닥 DNA를 만들기 위해 biotin을 덧붙였다. primer의 염기배열은 다음과 같다.

primer 1 : 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCC -3'

primer 2 : 5'-XGTT TCA ATA GAG ATA TAA AAT TCT TTC
ATA G -3' (X : Biotin)

2. Angiogenin 의 발현 및 분리

100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin이 포함된 LB 배양액에 재조합된 angiogenin 플라즈미드 (pBAng)가 들어있는 colony를 접종하여 하룻밤 동안 배양하였다. 그리고 이것을 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin과 20 μl antifoam이 포함된 LB 배양액에서 OD₆₀₀ 값이 0.7 이 될 때까지 배양하였다. OD값이 ≈ 0.7 에 이르렀을 때 0.1 mM 이 되도록 IPTG 를 첨가하여 2 시간 동안 배양하였다. 2 시간 후 cell culture 중 1 ml을 취해 microcentrifuge로 pellet 만을 회수하고 이것에 cracking buffer (60 mM Tris-HCl , pH 6.8 , 1 % 2-mercaptoethanol , 1 % SDS , 10% glycerol , 0.01 % bromophenol blue)를 첨가하여 vortex한 후 pellet을 녹였다. 그리고 SDS-PAGE를 실행하여 angiogenin이 발현 되었는가를 확인하였다. 확인 후 나머지 cell culture 는 refolding 과정을 진행시켰다.

Refolding 과정은 다음과 같다. 먼저, centrifuge (4000g, 10분, 4 $^{\circ}\text{C}$)를 실시하여 pellet만 회수하고 이것에 resuspension solution (20 mM Tris-HCl , 10 % sucrose , pH 7.6)를 첨가하여 pellet을 resuspension하였다. 그런 다음 2.5 mM PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA를 첨가하여 얼음위에서 45 분동안 방치하였다. 그 후 다시 2.5 mM PMSF를 첨가하여 sonication (7 micron)을 실행하였다. 다음으로 다시 centrifuge (17300g, 25 분, 4 $^{\circ}\text{C}$)를 실시하여 pellet만을 회수하고 washing solution(20 mM Tris-HCl , 10 % sucrose , pH 7.6 , 2.5 mM PMSF)과 ice-colded water를 사용하여 centrifuge (34800g, 30분, 4 $^{\circ}\text{C}$)를 몇 회 반복하면서 pellet을 washing 하였다. Washing된 pellet에 resuspension solution (7 M guanidine , 100 mM potassium phosphate , 100 mM mercaptoethanol , pH 7.5)을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ water bath에서 3 시간 동안 반응시켰다. 3 시간 후 50 mM Tris-Cl , 100 mM NaCl , pH 8.5 을 방울방울 떨어뜨리면서 위의 solution에 잘 섞이도록 하였다. 그리고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24-25 시간 방치하였다. 그 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 6-8 시간 stirring 하였다. 그리고 1 M의 NaCl를 solution에 천천히 가하면서 계속 stirring하였다.

다음으로 centrifuge (16300g, 30분, 4 °C)를 실시하여 supernatant만을 회수하여 ultrafiltration하였다. Ultrafiltration 마지막 시기에 10 mM Tris-Cl, pH 8.0 buffer를 첨가하여 re-ultrafiltration하였다. 그리고 이 ultrafiltered solution으로 SDS-PAGE 를 실시하여 angiogenin의 refolding을 확인하였다.

확인 후 ultrafiltered solution을 centricon을 이용하여 다시 고농도로 농축시켜서(1.5 ml 정도) HPLC를 수행하였다. HPLC 시 sample loading과 elution의 flow rate은 0.8 ml/min 이었으며 elution할 때 solvent B (0.08 % TFA in a 3:2:2 mixture of isopropyl alcohol : acetonitrile : dH₂O, solvent)는 0-40%로 하였다. 그리고 이 때 나타나는 각각의 peak로부터 fraction을 수집하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 재조합 angiogenin의 band를 확인하고 각 fraction을 모두 모아 lyophilization을 하였다. 그리고 이것을 RNase-free water로 녹여 absorbance를 측정하여(A₂₈₀) 농도를 결정하였다 ($\epsilon_{280} = 8.575 \times 10^3$).

3. 재조합된 angiogenin 의 ribonucleolytic activity 측정

전체 반응 부피는 100 μ l이며, 20 μ l assay buffer, 5 μ l fluorescein-RNA, 다양한 농도의 angiogenin, RNase A, 그리고 RNase-free water가 포함되어 있다. RNase-free water의 부피를 조정함으로써 전체 sample tubes의 부피를 일정하게 유지하였다. 반응은 fluorescein-RNA를 첨가시키면 시작한다. angiogenin과 RNase A 각각 37 °C에서 2 시간, 1 시간 동안 반응시켰다. 100 μ l의 quench buffer 를 첨가하여 10 분동안 상온에 방치함으로써 반응을 정지시켰다. Negative control (단지 fluorescein-RNA 만을 포함한 tube도 함께 똑같은 조건으로 반응에 포함시켰다.)

반응 정지 후, 각 sample을 borosilicate tube로 옮겨 fluorescence polarization system을 이용해 각각의 polarization 값 (mP)을 측정하였다.

4. 선별

선별은 모두 3가지 방법으로 각각 실행되었다. 3가지 선별방법에서 사용된 무작위 DNA pool과 primer 1, 2, 그리고 선별과정 후에 수행한 PCR 증폭 방법 및 조건은 동일하다. 대략적인 선별과정은 Fig 1.과 같다.

가. 외가닥 DNA 합성

외가닥 DNA의 합성을 위하여, PCR 증폭시에 사용하는 primer 2의 5' 말단에 biotin을 덧붙였다. biotin은 streptavidin-paramagnetic particle (SA-PMP)과 친화력이 있어서 DNA pool을 SA-PMP에 넣어주면 5' 말단에 존재하는 biotin때문에 SA-PMP와 결합하게 된다. 이것을 자석으로 한쪽을 잡아주고 0.5 x SSC buffer (1L H₂O당 4.38g NaCl, 2.2g sodium citrate, pH 7.0)로 2번 씻어준후 70 °C에서 5분간 가열하여 DNA를 denaturing한다. denaturation된 DNA가닥중 biotin이 말단에 있는 DNA 외가닥은 여전히 SA-PMP와 결합하고 있는 상태로 자석에 끌려있고, 나머지 가닥은 SA-PMP로부터 떨어져 나와 자유로운 상태가 된다. 이 상층액을 털어내므로써 외가닥 DNA를 얻을 수 있다.

나. 선별

(1) Membrane filtration method

외가닥 DNA (2 µg)을 90 °C에서 3분간 가열하여 완전히 denaturation시킨후 얼음에 5분간 방치하여 DNA가 제 나름대로의 2차 구조를 가질수 있도록 한다. 그리고 selection buffer (20 mM Tris-acetate, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂)에서 DNA pool과 angiogenin을 섞어 37 °C에서 적당 시간을 incubation한후 DNA는 통과할수 있으나 단백질은 통과하지 못하는 membrane에 vacuum을 걸어주면서 통과시킨다. 그리고 selection buffer로 충분히 씻어내어 결합력이 좋은 DNA만을 얻을수 있도록 한다. 단백질

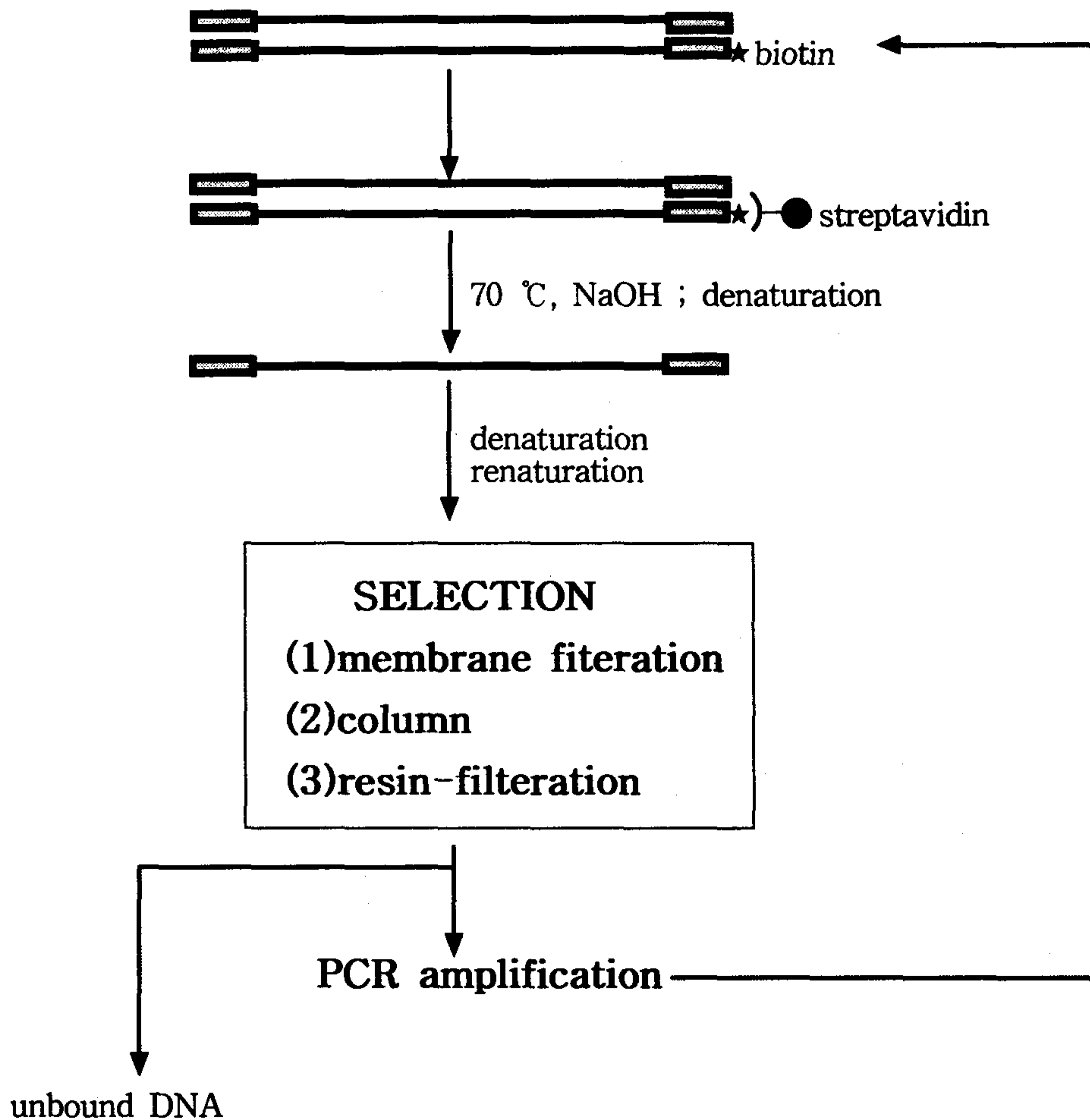


Fig 1. *In Vitro* Selection cycle. Single-stranded DNA was loaded into the preselection column (or tube) and was loaded into main selection column (or tube) containing ANG. DNAs unbound to ANG were eluted off from the selection column with 5 volumes of the selection buffer. Bound DNA was recovered and PCR-amplified, at which point the cycle was repeated

-DNA 결합체가 붙어 있는 membrane은 다시 urea가 들어 있는 buffer에서 denaturation 시키고, phenol로 extraction하여 단백질을 제거하고 선별된 DNA pool만 회수한다. 이렇게 선별된 DNA는 그 양이 너무 적어서 다음번 선별에 이용하기 위해서는 PCR 방법을 통한 증폭과정을 거쳐야 한다. PCR 반응시, buffer에는 0.5 μ mol의 primer 1과 2외에도 2.5 unit의 Taq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, 각각 200 μ M의 4가지 deoxyribonucleotide triphosphate, 50 mM KCl, pH 9인 10 mM Tris-HCl 그리고 0.1% Triton X-100이 포함되어 있다. PCR은 94 °C에서 45초, 45 °C에서 60초, 72 °C에서 60초간 진행되었다. PCR 산물은 chloroform과 phenol로 extraction한 후 3% agarose gel이나 5% polyacrylamide gel에서 확인 및 분리 정제 되었다.

(2) Column method

CNBr-activated Sepharose 4B와 angiogenin을 결합시켜 ANG-agarose affinity column을 만들었다. 선별에 이용되는 외가닥 DNA pool의 refolding 과정은 (1)의 방법에서와 동일하다. agarose resin에 비 선택적으로 결합하는 DNA를 제거하기 위해, 단백질이 결합되어 있지않은 agarose column에 외가닥 DNA pool을 먼저 통과시킨후 agarose resin에 결합하지 않은 DNA만을 다시 회수하여 ANG-agarose column에 통과시켰다. 단백질에 결합하지 않고 선별과 내를 부유하고 있는 DNA들을 제거하기 위해 충분한 양의 selection buffer로 씻어주었다. 그리고 단백질과 강력하게 결합하고 있는 DNA pool은 증류수로 씻어서 받아내었다. 이렇게 얻어진 DNA pool 역시 (1)에서와 동일한 증폭, 확인, 정제의 과정을 거쳤다.

(3) Agarose resin - filtration method

이 방법에서는 (2)에서 만든 ANG-agarose resin을 직접 털어내어 (1)에서

사용한 membrane에 통과시키는 방법을 사용하였다. 이것은 membrane에 비 특이적으로 결합하는 DNA를 효과적으로 제거할수 있는 장점을 가지며, 동시에 column에 쓰이는 resin의 잇점을 결합시킨 방법이다. 먼저 비 선택적으로 결합하는 종류의 DNA를 제거하기 위해 agarose resin만을 1.5 mL tube에 조금 덜어내어, 선별에 사용할 (1)에서와 동일한 방법으로 refolding된 DNA pool과 섞어 37 °C에서 10분정도 방치해 둔다. 그리고 resin을 원심분리기로 가라앉힌후 상층액만을 얻어 다음과정에서 사용한다. 선별에 사용할 DNA와 동일한 몰수의 단백질이 결합되어 있는 ANG-agarose resin을 1.5 mL tube에 덜어낸후 전-선별을 거친 DNA와 섞어준다. 37 °C에서 적당 시간 incubation한후 (1)에서 사용된 membrane에 통과 시켜준다. selection buffer로 충분히 씻어주어 resin사이에서 부유하고 있는 종류의 DNA를 제거한다. 이때 보다 효과적인 washing을 위해 vacuum을 사용하는데 resin이 마르지 않도록 vacuum사용을 적절하게 조절해 주어야 한다. washing후, DNA-ANG-agarose resin의 복합체가 쌓여있는 membrane을 새로운 1.5 mL tube에 옮겨넣고 적당량의 selection buffer로 씻어 DNA-ANG-resin의 복합체를 membrane에서 분리해 낸다. 그리고 phenol로 extraction해서 단백질과 resin은 제거하고 선별된 DNA만을 얻어낸다. 이렇게 얻어진 DNA는 (1)에서와 동일한 증폭, 확인 그리고 정제의 과정을 거친다.

5. Gel mobility shift assay

선별된 각각의 DNA는 [γ - 32 P] ATP와 T4 polynucleotide kinase로 5' 말단을 labeling하였다. gel mobility shift assay의 조건은 기존에 알려진 문헌을 참고하였다 (9-11). 선별된 DNA는 selection buffer에서 선별 과정과 동일한 온도 및 시간 조건에서 refolding되었다. 결합반응은 16 μ l의 selection buffer에서 10분간 진행되었다. 4 μ l의 glycerol을 첨가하여 8% non-denaturing polyacryamide gel에서 전기 영동 분리되었다.

6. Aptamer에 의한 재조합 angiogenin의 ribonucleolytic activity 의 inhibition 조사

선별된 DNA pool중 (1)의 방법으로 7번 선별한 DNA pool, (2)의 방법으로 6번, 13번 선별한 2가지 종류의 DNA pool, (3)의 방법으로 7번, 15번 선별한 2가지 종류의 DNA pool, 그리고 처음으로 선별에 사용했던 시작 무작위 DNA pool 을 이용하여 Angiogenin의 활성을 저해하는 정도를 측정하는 inhibition assay를 수행하였다.

전체 반응 부피는 100 μ l이며, 10 μ l selection buffer, 5 μ l fluorescein-RNA, 50 nM angiogenin, 여러 농도의 aptamers, RNase-free water가 포함된다. 먼저 selection buffer, RNase-free water, aptamer 로 이루어진 sample tube를 90 $^{\circ}$ C에서 3 분동안 , ice에서 5 분동안 반응시킴으로써 aptamer를 refolding시켰다. 이 용액에 angiogenin을 첨가시켜 37 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 방치하였다. 그 후 fluorescein-RNA를 첨가시킴으로써 반응을 시작하였다. 반응은 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간 동안 하였다.

반응에는 대조시료인 fluorescein-RNA만을 포함한 시료와 fluorescein-RNA + angiogenin를 포함하는 시료도 같은 조건으로 함께 포함시켰다. 2 시간 후 각각의 시료를 borosilicate tube로 옮겨 fluorescence polarization system으로 polarization 값(mP)을 측정하였다. 각 sample의 mP 값을 다음의 식을 이용하여 Ribonucleolytic activity of angiogenin (%)로 환산하여 plotting하였다.

Ribonucleolytic activity of angiogenin (%)

$$= \frac{\text{[fluorescein-RNA만을 포함한 시료의 mP]} - \text{[fluorescein-RNA + angiogenin + aptamer)를 포함하는 시료의 mP]}}{\text{[fluorescein-RNA만을 포함한 시료의 mP]}} \times 100$$

/ [fluorescein-RNA만을 포함한 시료의 mP - (fluorescein-RNA + angiogenin)를 포함하는 시료의 mP]

제 3 절 결과 및 고찰

1. 재조합된 angiogenin 의 발현 및 분리

재조합된 angiogenin을 실험방법에서 기술한 것 같이 대장균에서 발현한 뒤, 분리 정제하였다. 각 분리단계에서 시료를 취하고, 이에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과가 Fig 2에 주어저 있다. 재조합된 angiogenin이 들어있는 벡터 pBAng를 대장균에서 발현시킨 후, angiogenin이 발현되는지를 조사한 것이 lane 6에 주어저 있다. 재조합된 angiogenin은 inclusion body형태로 발현됨을 알 수 있었다. Refolding과정을 거친 후, 이 시료를 HPLC로 분리하기 위하여 농축시킨 것이 lane 3과 4에 주어저 있다. 최종적으로, HPLC를 이용하여 순수하게 분리한 것이 lane 2에 주어저 있다. 대조시료로 우유에서 분리 정제한 angiogenin이 lane 7에 주어저 있다.

2. 재조합된 angiogenin의 ribonucleolytic activity

재조합된 angiogenin이 활성 즉, ribonucleolytic activity를 가지고 있는지를 조사하였다. Angiogenin은 비록 ribonucleolytic activity를 가지고 있지만, Pancreatic RNase A와 비교시 약 10^5 와정도 더 낮은 활성을 가지고 있다. 따라서, angiogenin의 ribonucleolytic activity를 측정하기 위해서는 μg 정도의 많은 양을 사용하는 방법 (tRNA Assay)을 사용하거나 또는 적은 양을 사용하더라도 활성을 측정할 수 있는 민감한 방법을 사용하여야만 한다.

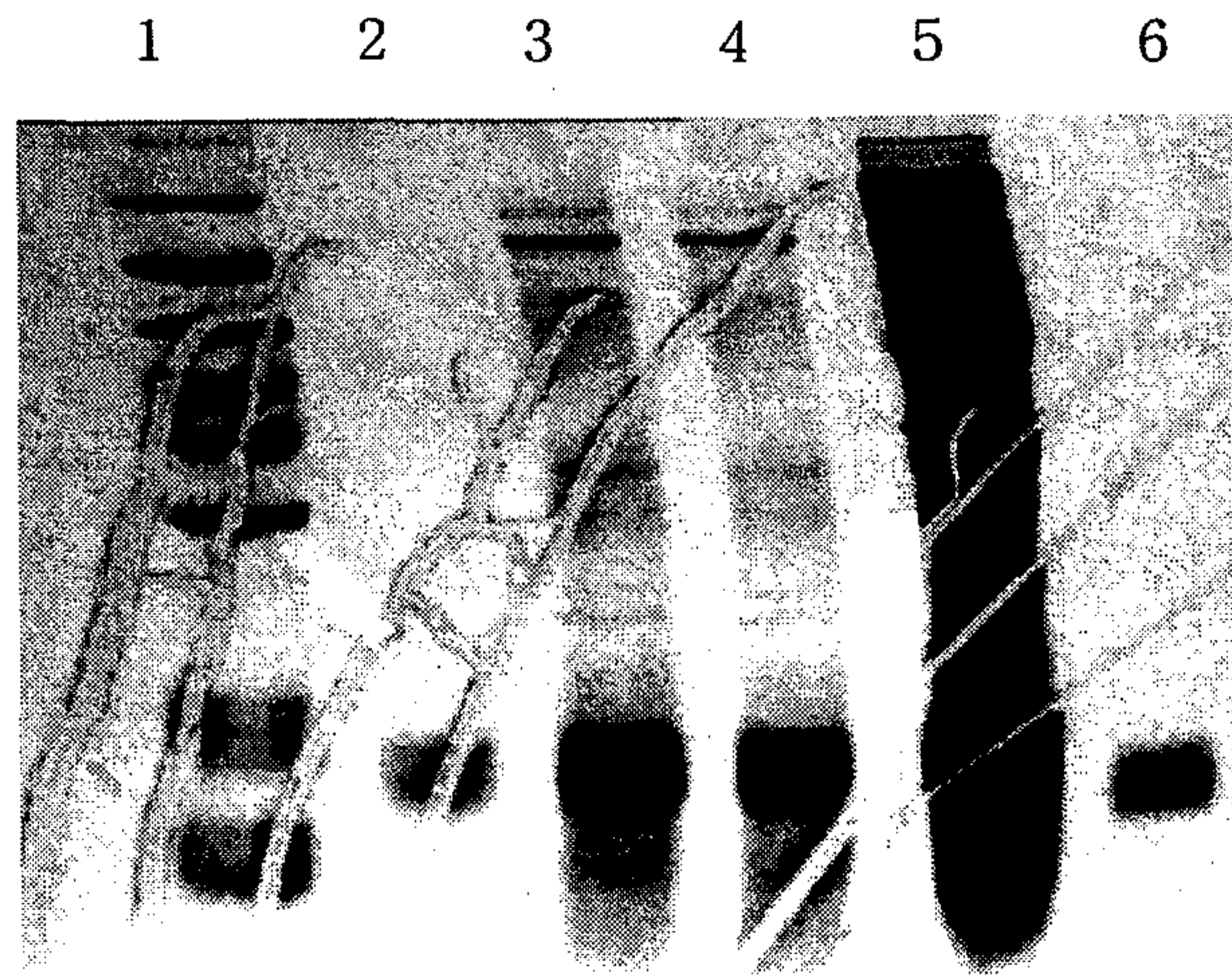


Fig 2. Purification of recombinant angiogenin Purification of recombinant angiogenin after transformation of *E. coli* cell transformed with plasmid pBAng. Samples were electrophoresed on 15 % polyacrylamide gels containing SDS.

Lane 1 : Protein marker

Lane 2 : HPLC로 정제한 angiogenin 시료

Lane 3 : HPLC로 정제하기전 농축된 시료

Lane 4 : HPLC로 정제하기전 농축된 시료

Lane 5 : 발현후 배양액을 원심분리하고, 침전물을 craking buffer 로 가용시킨 시료

Lane 6 : 우유로부터 분리한 Angiogenin

본 연구에서는 적은 양의 angiogenin을 사용하더라도, angiogenin의 ribonucleolytic activity를 민감하게 측정할 수 있는 방법을 개발 사용하였다. 형편광(Fluorescence Polarization)은 분자량에 매우 민감하므로, RNA에 Fluorecein이 표지된 Fluorescein-RNA를 angiogenin의 기질로 사용하고, angiogenin의 효소활성을 Fluorescein-RNA의 형편광을 측정함으로써 측정하였다. Fig 3.에는 재조합된 angiogenin과 RNase A의 ribonucleolytic activity를 Fluorescein-RNA의 형편광을 측정하여 구한 것이 주어져 있다. 재조합된 angiogenin과 RNase A의 농도가 증가할수록 Fluorescein-RNA의 형편광이 감소함을 알 수 있다. 이는 재조합된 angiogenin과 RNase A에 의해 RNA가 잘려짐으로 인해, RNA의 분자량이 감소하게 되고 따라서 Fluorescein-RNA의 형편광값이 작아지기 때문이다.

참고로, 우유로부터 angiogenin을 분리할 경우, 여러 가지 RNase가 오염되어 있다. 따라서, tRNA assay 또는 본 연구에서 사용한 방법으로는 angiogenin만의 ribonucleolytic activity를 순수하게 측정할 수 없다.

3. Angiogenin에 결합하는 DNA aptamer의 선별

처음 합성된 10^{17} 가지의 120mer DNA pool중 10^{13} 가지를 primer 1 과 2로 증폭한 후, streptavidin과 친화력이 있는 biotin이 5' 말단에 첨가되어 있는 DNA가닥을 자석에 붙여 제거한 후 나머지의 외가닥 DNA를 얻어서 시작 pool로 사용하였다. 3가지 서로 다른 선별방법으로 angiogenin과 강하게 결합하는 종류의 DNA를 선별하였으며 각각의 선별방법에 따른 실험은 독립적으로 수행되었고, 모두 무작위 DNA pool로부터 시작되었다. 3가지 선별방법중 첫 번째인 membrane filtration 방법으로는 7번, 두 번째인 column을 이용하는 방법으로는 13번, 마지막으로 resin-filtration방법으로는 15번의 선별과정을 반복하여 선별 DNA를 얻었다.

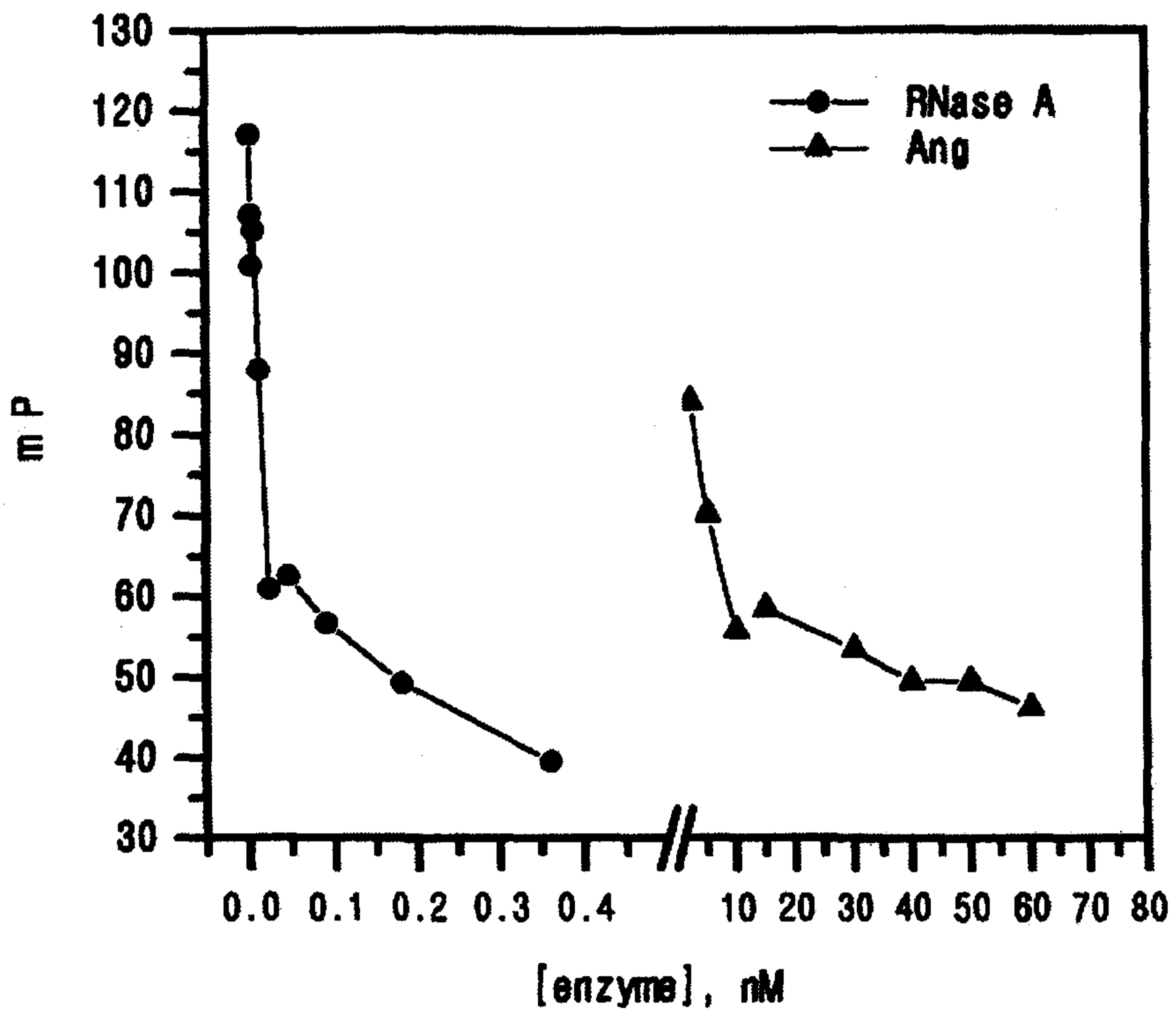


Fig 3. Ribonucleolytic activity of angiogenin and RNase A.

4. 선별 aptamer의 angiogenin에 대한 결합성 조사

선별된 aptamer의 angiogenin에 대한 결합성을 조사하고, 어떤 선별방법이 aptamer 선별에 더 효과적이었는지 비교하기 위하여 시작 무작위 DNA pool과 column을 이용하여 선별한 DNA pool (C13)과 resin-filtration방법으로 선별한 DNA pool (F15)을 이용하여 gel mobility assay를 수행하였다 (Fig 4). membrane filtration방법으로 선별한 7번째 DNA pool (m7)은 binding assay는 하지 않고 후에 inhibition assay만을 수행하였다. C13, F15 그리고 시작 무작위 DNA pool 모두 5' 말단을 동위원소인 [γ - 32 P]ATP을 이용하여 labeling하였다. 동위원소로 표지된 동일한 양의 70pmol DNA를 여러 가지 농도의 angiogenin (0배, 20배, 40배, 50배) 과 섞어준후 8% polyacrylamide gel에서 전기영동 시켜 주면, 단백질과의 결합성이 좋은 DNA일수록 더 적은 단백질 농도에서부터 단백질과 결합하여 free DNA보다 더 위쪽에 새로운 band를 나타낼 것이다. aptamer C13과 F15의 경우 무작위 DNA 에서와는 달리 20배의 angiogenin과 섞어준 lane에서부터 밑에 남아있는 free DNA양은 줄어들고 대신 그 위에 새로운 band가 나타나는 것을 관찰할 수가 있었다 (Fig 4.) 무작위 DNA의 경우에는 그 보다 angiogenin의 양이 더 많은 40배 anangiogenin lane에서부터 위쪽 band가 나타났다. 이상의 결과에서 선별과정을 거친 DNA가 그렇지 않은 무작위 DNA 보다 단백질과 더 잘 결합한다는 사실을 확인할수 있었다. 그러나 이러한 binding assay만으로는 결합력의 확연한 차이를 기대하기 어려웠고 또한 어떠한 선별방법이 더 효과적인지 결정하기가 용이하지 않았다.

5. Aptamer에 의한 재조합된 angiogenin의 ribonucleoytic activity inhibitionon

Aptamer에 의해 angiogenin의 활성이 억제되는 지를 형편광을 측정함으

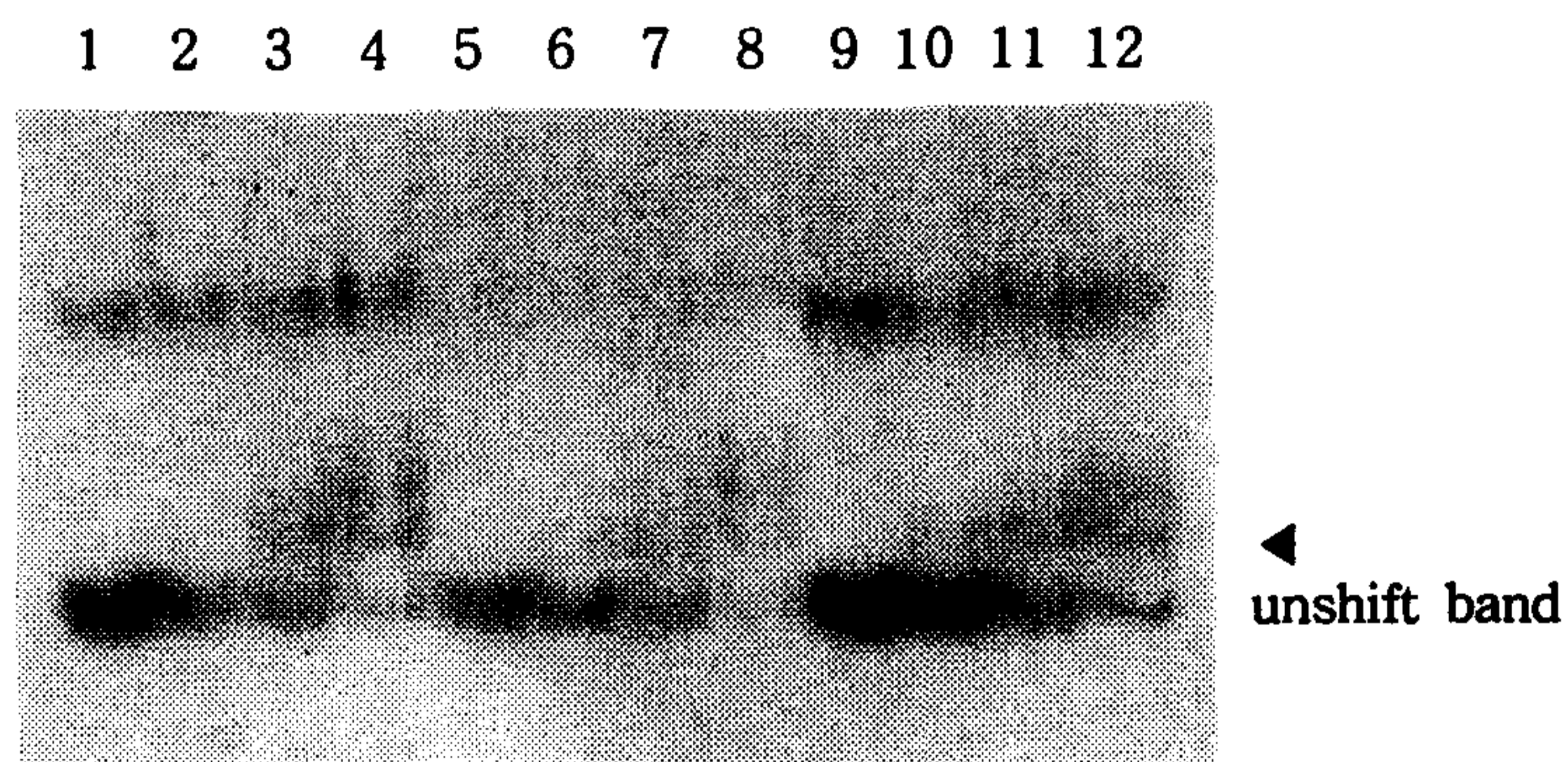


Fig 4. Gel mobility shift assay of complexes between aptamers and angiogenin. Selected DNA pools were labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ at the 5' end. The labeled DNAs were denatured and used for the binding assay. The arrows indicate the retarded bands. In each lane, total DNA of 70 fmol was used. Three kinds of DNA pool were used for the binding assay. lane 1-4, random DNA pool ; lane 5-8, aptamer selected by column method. ; lane 9-12, aptamer selected by resin-filtration method. The amounts of ANG used. : lane 1, 5, 9, no protein ; lane 2, 6, 10, 1.4 pmol ; lane 3, 7, 11, 2.8 pmol ; lane 4, 8, 12, 3.5 pmol.

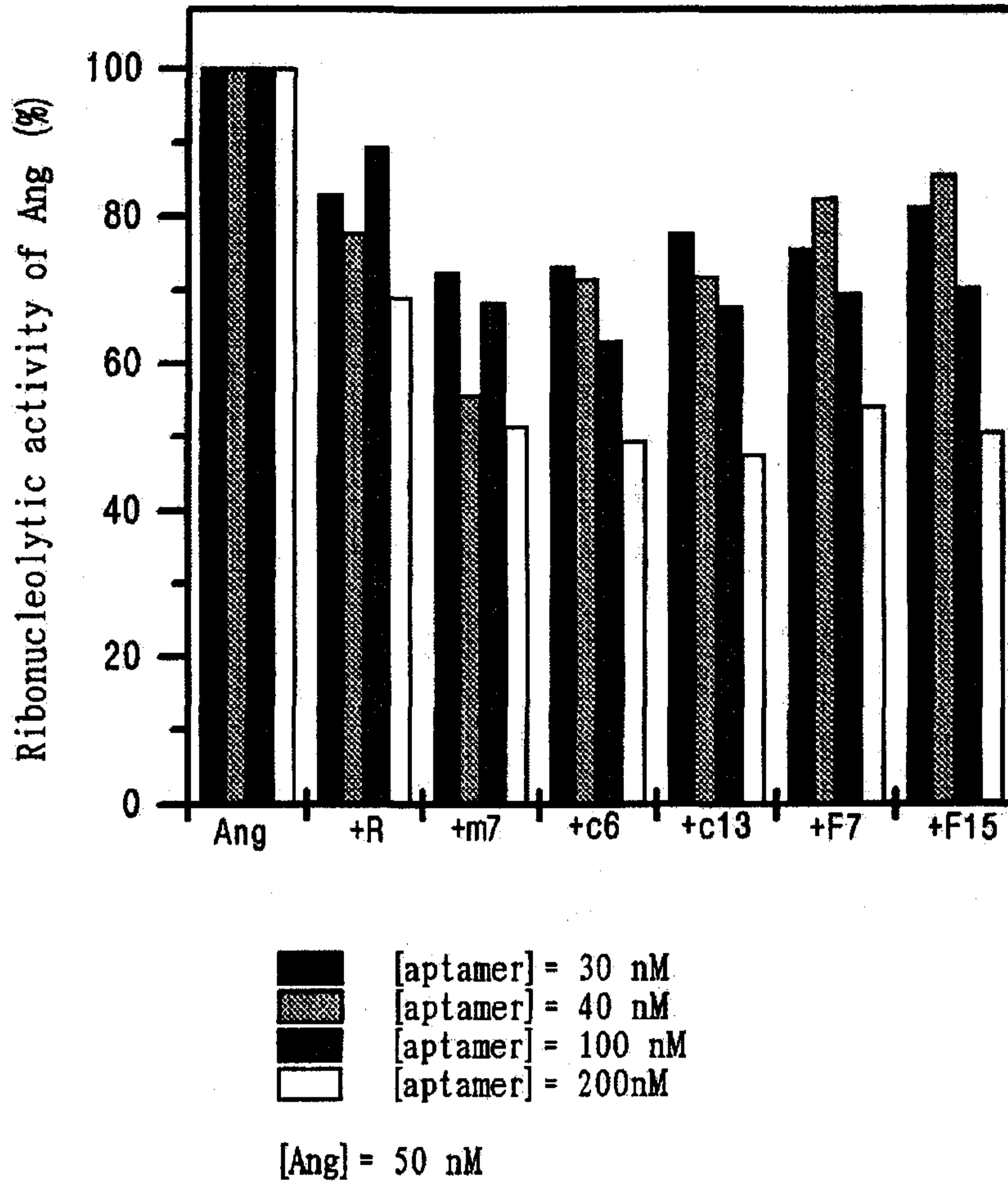


Fig 5. Inhibition of ribonucleolytic activity of angiogenin by various aptamers. 실험에 사용된 ANG의 농도는 50 nM로 모두 동일하였다. assay에 사용된 aptamer종류는 random pool과 membrane으로 선별한 pool, column으로 선별한 6번째 pool과 13번째 pool, resin-filtration으로 선별한 7번째 pool과 15번째 pool등 모두 6가지였다. aptamer의 농도를 증가시켜가며 ANG의 activity를 조사하였으며, 그 농도는 30 nM, 40 nM, 100 nM, 200 nM이었다.

로써 조사하였다. 먼저 Aptamer와 angiogenin을 함께 혼합하고, 이후 fluorescein-RNA를 첨가하고 angiogenin의 ribonucleolytic activity를 조사하였다. Fig 5.에 각 aptamer에 의해 angiogenin의 ribonucleolytic activity가 억제되는 결과가 주어져 있다. 대조시료인 R에 의해서도 angiogenin의 효소활성이 억제되지만, 상대적으로 다른 시료에 비해서 약한 억제활성을 보여주고 있다. 선별된 aptamer는 angiogenin의 4배 농도가 사용되었을 경우에 대략 50%가량 ribonucleolytic activity를 inhibition함을 보여주고 있다. 이러한 결과로 보아 선별된 aptamer가 angiogenin의 inhibitor로 사용될수 있는 충분한 가능성을 가지고 있다고 생각된다. 그러나 이 aptamer가 angiogenin을 inhibition하는 약제로 이용되기 위해서는 좀더 강력한 angiogenin에 대한 결합력과 angiogenin activity inhibition을 보이는 aptamer의 선별이 더 진행되어야 할것이다. 3가지 방법으로 선별한 aptamer들은 비교적 비슷한 inhibition효과를 보이고 있어서, 더 강력한 결합성을 가지는 aptamer를 얻기위해 좀더 선별을 수행할 경우 3가지 방법중 어느방법을 이용하든지 무방할것으로 생각된다.

제 4 절 참고 문헌

1. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) *Science* 249, 505-510
2. Famulok, M., and Szostak, J. W. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3990-3991.
3. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J. (1992) *Nature* 355, 564-566
4. Kurachi, K., Davie, E. W., Strydom, D., J., Riordan, J. F., Vallee, B. L. (1985) *Biochemistry* 24, 5494-5499.
5. Folkman, J., and Cotran, R. S. (1976) *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16, 207-248

6. Gullino, P. M. (1981) *Handb. Exp. Pharmacol.* **57**, 427-449.
7. Schor, A. M., and Schor, S. L. (1983) *J. Pathol.* **141**, 385-413.
8. Saxena, S. K. Rybak, S. M., Davey, R. T. Youle, R. J. and Ackerman, E. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21982-21986
9. Fried, M., and Crothers, D. M. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 6505-6525.
10. Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., and Sharp, P. A. (1986) *Nature* **319**, 154-158.
11. Strauss, F., and Varshavsky, A. (1984) *Cell* **37**, 889-901.
12. James R. Lundblad, Megan Laurance, and Richard H. Goodman. (1996) *Molecular Endocrinology* **10**, 607-812
13. Russo N, Nobile V, Di Donato A, Riordan JF, Vallee BL. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3243-3247

제 9 장 HCV RNA helicase의 활성을 조절하는

RNA aptamer의 선별 및 특성

제 1 절 서설

간염 C형 바이러스인 Hepatitis C Virus (HCV)는 A형과 B형 간염이 아닌 주요 원인의 virus로 알려져 왔으며, 1989년에 분자 생물학의 발전을 기초로 하여 cloning되었다. HCV는 약 9400 뉴클레오티드로 이루어진 positive strand RNA를 유전자로 가지고 있는 enveloped virus이다. RNA 유전자로부터 3010 아미노산의 polypeptide가 형성되며, 이 polypeptide는 숙주와 virus 자신의 protease에 의해 여러 가지의 단백질로 가공된다. HCV의 유전자 배치는 (N말단)-C-E1-E2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-(C말단)으로 이루어져 있다. 특히 비구조성의 단백질 (non-structural protein)중, NS3 단백질은 N말단의 serine proteinase와 C말단의 nucleotide triphosphatase (NTPase)/RNA helicase를 동시에 지니고 있다. RNA helicase는 NTP의 분해를 에너지원으로 하여 두 가닥 RNA를 외가닥 RNA로 풀어낸다. 이러한 활성은 HCV의 RNA replication이나 translation에 중요한 역할을 한다.

만성간염, 간경변증, 간암을 일으켜 문제가 되는 것은 주로 B형 및 C형 간염이다. B형 간염은 우리 나라 전국민의 7~10%가 보균자며, B형 간염백신 접종으로 예방이 가능하다. C형 간염의 보균자는 B형 보균자의 절반이하이지만, 현재까지 예방책이나 치료제가 없다. 대개 중년기 이후에 생기며 주된 원인은 오염된 혈액의 수혈 등으로 감염자의 체액에 노출될 때 감염될 수 있다. 감염된 환자의 대다수가 20여 년의 장기간에 걸쳐 만성으로 진행한다.

한편, 최근에는 임의의 무작위 핵산 pool에서 특정 단백질이나 대상 물질

에 결합하는 핵산을 선별하는 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라는 실험적인 시도가 다양하게 응용되고 있다. 이 방법은 인위적인 진화의 관점에서, 단백질과 핵산 또는 핵산과 핵산 사이의 결합성이나 상호 적용의 의미를 해석하는데 획기적인 장치가 된다.

본 실험의 목적은 바이러스성 물질이 생체에서 작용하는 대사 유전적 메커니즘을 시험관내 환경에서 조사, 규명하고 이를 응용하는데 있다. 실험 계획을 체계적으로 기술하면 다음과 같다.

첫째, HCV의 helicase가 가장 강력히 결합하는 RNA의 염기를 선별한다. Helicase는 두 가닥 RNA의 unwinding에 작용하고 임의의 RNA와 10^{-7} M의 해리 상수를 가진다 사실은 이미 밝혀졌다. 하지만, helicase에 대해 random RNA보다 높은 친화력을 지닌 RNA가 존재할 수 있으므로 SELEX를 이용하여 효과적으로 helicase RNA aptamer를 선별할 수 있다.

둘째, random RNA와 비교하여 선별 RNA의 helicase에 대한 결합상수를 조사한다. 즉, 선별 RNA가 어느 정도 더 잘 결합하며 helicase를 선택적으로 인식하는지 정량적으로 계산한다.

셋째, 선별된 RNA가 이차원 또는 삼차원적으로 어떤 구조를 형성하며, 이들은 helicase의 어느 부위에 결합하는지 조사한다. RNA는 자체적으로 고유한 3차 구조를 지닐 수 있다. 그러므로, 염기서열 뿐 아니라 입체적인 구조가 helicase와 상보적으로 형성되어 상호 인식에 중요한 인자로 작용할 것이다.

넷째, ATP가 가해진 상황에서 helicase가 RNA에 결합하면 다시 분리되는 데, RNA-protein 분리의 속도론적 해석을 시도한다. 앞의 언급처럼, helicase가 RNA와 결합하면 ATP 존재 하에서는 RNA의 구조가 풀어지며 RNA-helicase complex도 와해된다. 이때, 왜 helicase에서 분리된 RNA는 다시 helicase에 가역적으로 결합하지 않는지, 그리고 ATP가 에너지원 이외에 또 다른 요인으로 작용하는지를 조사한다. 또한 시간에 따라 분리 정도가 어떻게 변화하는지 정량

적으로 관찰한다.

다섯째, 선별 RNA가 helicase의 두 가닥 RNA인 substrate인식을 어느 정도 저해하고, 실제 helicase의 활성을 억제하는지의 여부를 실험한다. 만약, 선별 RNA가 helicase의 중요한 활성 부위를 인식한다면 helicase는 자신의 substrate 인식에 저해를 받을 것이다. 또는 구조적 변화의 영향으로 인해 활성이 감소하거나 변화할 것이다. 이러한 가설을 바탕으로 RNA aptamer에 의한 helicase의 활성 변화를 측정한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. helicase의 발현과 정제

pET21b 벡터의 *Bam*HI과 *Hind*III 사이에 HCV의 NS3가 cloning된 plasmid인 pET21b-NS3HCV를 BS21(DE3) 숙주를 배양하여 helicase를 발현시켰다. 발현된 helicase의 C-terminus에는 6개의 His residue가 연결되어 있어서 His-bind resin을 이용하여 정제하였다 (1). 즉, 1 mM의 IPTG로 유도 배양된 대장균을 파괴하여 세포 추출물의 용액 부분을 His-bind column에 loading하고, resin에 붙어 있는 단백질을 binding buffer [1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9]와 elution buffer [5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9]의 gradient에서 fraction 별로 elution하였다. Elution된 일부를 10% SDS-PAGE에서 확인한 후, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 완충용액에서 투석하였다. 그리고, 20% glycerol을 첨가하여 -72°C에서 보관하였다.

2. 핵산의 합성 (제7장 참고)

선별에 사용될 103 뉴클레오티드 (nt)의 RNA는 42 nt의 길이를 무작위

배열로 가지는 pool로서 120 base pair (bp) DNA로부터 *in vitro* transcription 되었다. Tuerk와 Gold의 기술의 참고로 하여(2), 42n template는 3개의 짧은 oligonucleotide를 ligation하여 만들었다. prim #1과 #2는 prim #3, 4, 5를 연결하는 상보 가닥으로 사용되었으며, 무작위 42n을 포함한 prim #4의 손실을 최소화하는 조건에서 ligation하였다. 120nt의 외가닥 DNA pool을 5% acrylamide denaturing gel에서 정제한 후, prim #s1과 #6로 PCR 증폭하였다. 증폭된 DNA로부터 T7 RNA polymerase를 이용하여 103nt의 RNA를 transcription한 후 다시 PAGE에서 정제하였다.

3. 선별 과정

5 mM의 ATP가 포함되지 않은 또는 포함된 helicase buffer [25 mM MOPS-KOH (pH6.5), 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT]에서 각각 선별이 실행되었다. 해당 buffer에 있는 RNA를 70°C에서 3분, 얼음에서 5분 방치한 후 구조를 취하게 한다. RNA의 1/50에서 1/500에 해당하는 helicase를 첨가한 후 37°C에서 일정시간 동안 반응시킨다. ATP가 첨가 된 경우에는 37°C에서 1시간을, ATP가 없는 경우는 5분간 두었다. helicase에 결합된 RNA를 nitrocellulose에서 걸러내고, 5 ml의 선별 buffer로 씻어준다. Helicase-RNA 복합체가 결합되어있는 filter를 100 mM sodium citrate (pH5.0), 3 mM EDTA (pH8.0), 7 M urea의 용액에 넣은 후, 65°C에서 RNA를 denaturation한다. 분리된 RNA는 phenol extraction하여 AMV-RT로 reverse transcription하여 증폭한다.

4. 두 가닥 RNA의 준비

helicase 활성을 조사하기 위한 substrate로 길이가 다른 두 가닥의 RNA를 사용하였다 (Fig. 1). 긴 가닥은 pGEM1 plasmid를 *Pvu*II로 자르고 짧은 가닥은 pSP65 plasmid는 *Bam*HI으로 잘라 SP6 RNA polymerase를 이용하여 *in*

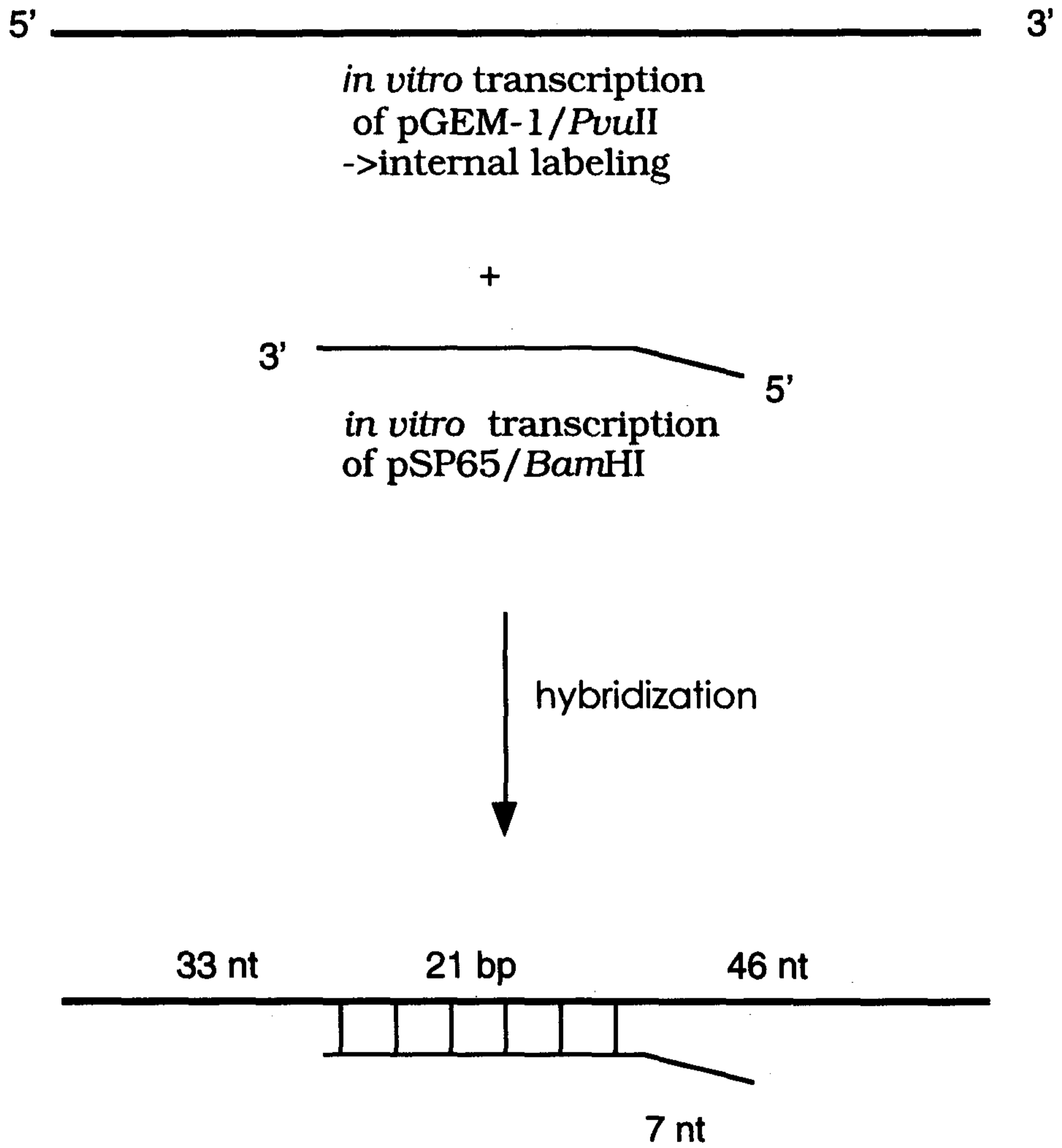


Fig. 1 두 가닥 RNA의 정제 및 확인

in vitro transcription으로 얻을 수 있다. 각 가닥을 hybridization buffer [20 mM HEPES-KOH pH7.6, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS]에서 섞어 준다. 95°C에서 5분간 가열한 후, 65°C에서 30분간 그리고 실온에서 2시간 방치하여 두 가닥 RNA를 만든다. *in vitro* transcription할 때에 긴 가닥 RNA를 [α -³²P] CTP로 labeling하였기 때문에, 두 가닥 RNA를 8% native polyacrylamide gel에서 전기영동하고 auto-radiography로 그 위치를 확인 및 정제하였다.

5. binding assay

5 mM의 ATP가 포함된 helicase buffer나 포함되지 않은 helicase buffer 각각에서 helicase와 [γ -³²P] ATP로 5' label된 RNA를 37°C에서 반응시킨다. 반응물의 10%에 해당하는 glycerol을 넣고 8% native gel에 전기 영동한다. 이때 전기영동 buffer는 0.25 x TBE를 사용하고, 10 mA의 낮은 전류에서 실행한다. helicase의 결합에 따라 RNA의 다른 이동 정도를 autoradiograph로 확인한다.

6. helicase 활성 조사

helicase 활성 조사는 5 mM ATP가 포함된 37°C helicase buffer에서 실행되었다. 최종 반응물은 5 x termination buffer [0.1 M Tris-HCl (pH7.4), 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1% NP40, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 50% glycerol]를 1 x 이 되게 첨가하여 반응을 종결시킨다. 반응이 끝난 aliquots는 8% native polyacrylamide gel에서 80 V로 4시간 전기 영동하고, 두 가닥 RNA와 unwound RNA strand는 autoradiography로 확인하였다.

7. 선별 RNA의 염기 서열 결정

선별 DNA를 prim #8과 #9로 증폭하여 pUC9의 *Bam*HI과 *Hind*III 사이에

cloning하였다. 각 clone의 plasmid를 pUC/M13 reverse primer로 sequencing하였다.

제 3 절 결과

1. helicase에 결합하는 RNA의 선별

helicase는 (-)ATP인 상태와 (+)ATP인 상태에서 RNA와 결합하는 양상이 다르다. (-)ATP에서는 두 가닥의 unwinding이 일어나지 않으며 RNA-helicase complex가 시간의 경과에 상관없이 계속 유지된다. 반면, (+)ATP에서는 한 가닥 RNA로 풀어지며 RNA-helicase complex 역시 시간이 지날 수록 감소한다. 두 상황 모두에서 helicase에 결합하는 RNA를 선별하였다. (-)ATP에서 helicase에 대한 선별을 15 cycle 수행하였다. (+)ATP에서는 25 cycle 수행하였는데, 선별 중간 단계인 13 cycle과 19 cycle에서 helicase와의 결합력이나 염기 서열을 조사하였다. 그리고, 22 cycle 이후로 filter에 결합하는 비특이성 RNA를 제거하기 위해서 선별에 앞서 전선별의 과정을 세 번씩 되풀이하였다. 선별 RNA를 RT-PCR할 때, PCR cycle 수가 많으면 120 bp가 아닌 다른 위치에서 증폭 DNA가 관찰되었다. 그래서 매 선별 과정에서 120 bp의 DNA가 단일 band로 관찰되는 PCR condition을 조절하였다 (data 생략). (-)ATP에서 선별된 RNA를 'Hel'이라고 명하였으며, (+)ATP 선별 RNA를 'ATP'라고 명하였다.

2. helicase의 정제

1 mM IPTG로 induction된 pET21-NS3HCV/BL21(DE3)의 helicase는 보고된 논문의 내용처럼 SDS-PAGE에서 54 kDa임이 확인되었다 (1). binding

buffer와 elution buffer의 gradient에서 0.5 ml/min의 속도로 His-bind resin에서 elution하였다. 한 fraction에 1.3 ml씩 배당하였으며, fraction 1~4 사이에 대부분의 helicase가 얻어진다 (Fig. 2). 하지만, IPTG induction하지 않은 것에 비해 IPTG induction에서 helicase의 발현이 현저히 증가하지는 않았다. 정제된 helicase는 50 mM Tris-HCl과 20% glycerol에 녹여 -72°C에서 보관하였다. Bradford method에 의해 측정된 농도는 9 ng/ μ l이다.

3. gel mobility shift assay

'Hel' RNA는 random RNA에 비해 helicase에 결합력의 차이가 없었다 (data 생략). 하지만, 13번째 'ATP' RNA는 (+)ATP에서 한시간 동안 helicase에 결합시켰을 때, helicase에서 분리되지 않고 random 보다 2~3배 결합을 잘한다 (Fig. 3).

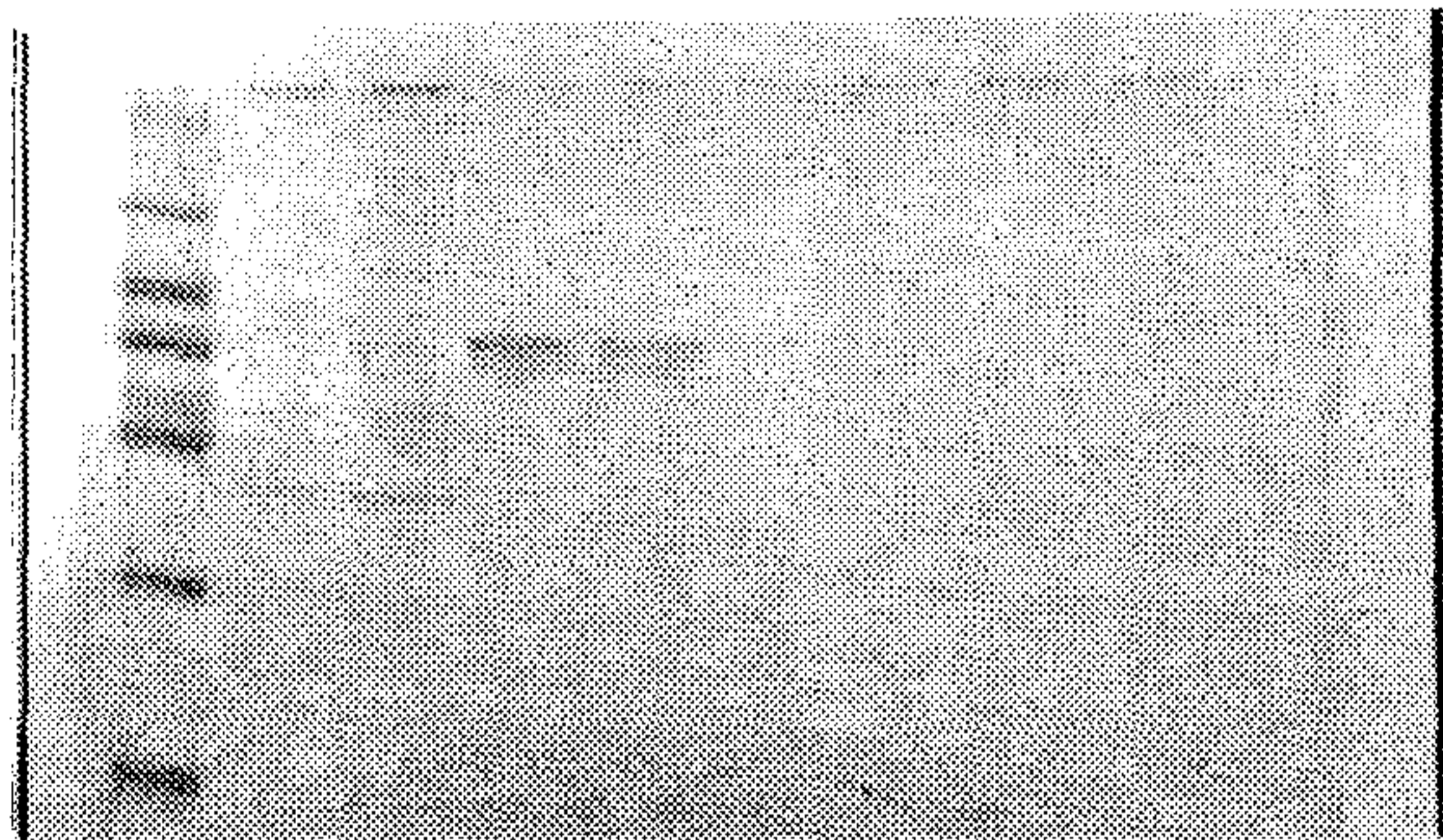
한편, random RNA와 helicase를 시간별로 반응을 시킬 경우 (-)ATP에서는 시간에 관계없이 RNA-helicase complex가 그대로 유지된다. 하지만, (+)ATP에서는 시간이 증가할 수록 RNA-helicase complex의 band 진하기는 감소한다 (Fig. 4).

helicase의량을 증가시켜 random RNA와 binding assay해 본 결과 RNA: helicase=1: 3에서 shift band가 관찰되며, RNA: helicase=1: 5.7에서 대부분의 RNA가 shift되었다 (data 생략).

4. filter binding assay

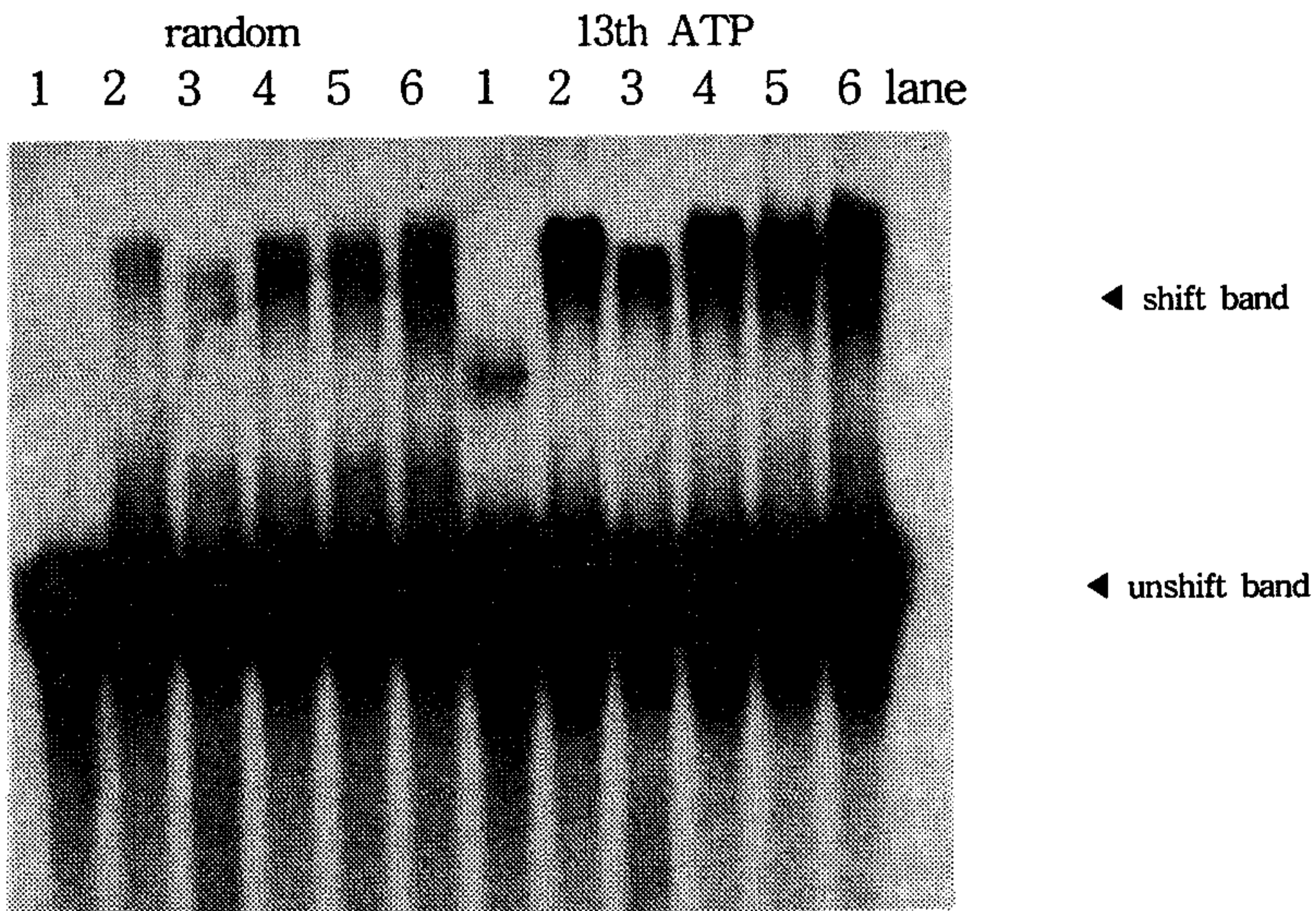
filter binding assay 역시 (-)ATP, (+)ATP의 상황에서 실행하였다. non-specific한 RNA-protein 결합을 최소화하기 위해 BSA를 과다로 첨가하였다 (Fig. 5). (-)ATP에서 random이나 15번째 'Hel' pool은 non-specific 하게 BSA에 결합한다. 하지만, 'ATP' pool은 BSA에 결합하지 않는다. (+)ATP에서

IPTG fraction
marker (-) (+) 2 4 6 9 11 13 19



◀ 54 kDa helicase

Fig 2. Helicase의 정제



lane 1	lane 2	lane 3	lane 4	lane 5	lane 6
	RNA	↑ 60min	RNA	↑ 15min	↑ 0min
	↑ 60min	RNA	↑ 15min	RNA	RNA
RNA	Hel	Hel	Hel	Hel	Hel
ATP	ATP	ATP	ATP	ATP	ATP

Fig 3. Helicase에 대한 random RNA와 13번째 'ATP' RNA의 gel mobility shift assay. 각 lane에 사용된 helicase는 0.3 pmol, [γ - 32 P] ATP로 5' label된 각 RNA는 0.1 pmol, cold random RNA는 1.68 pmol이다.

time(min)	0	0	5	15	20	30	30
ATP	-	+	+	+	+	+	-
Helicase	-	+	+	+	+	+	+

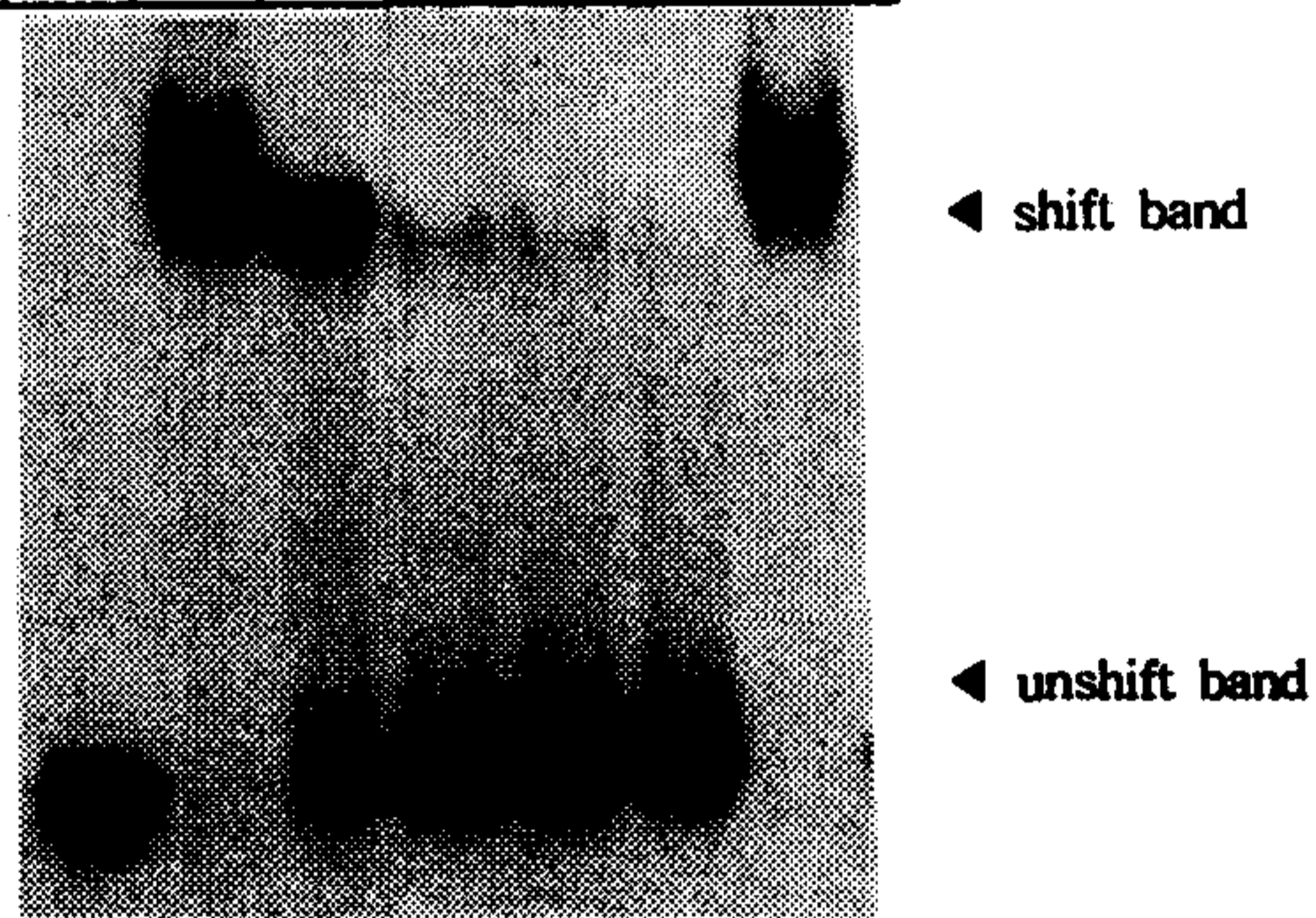
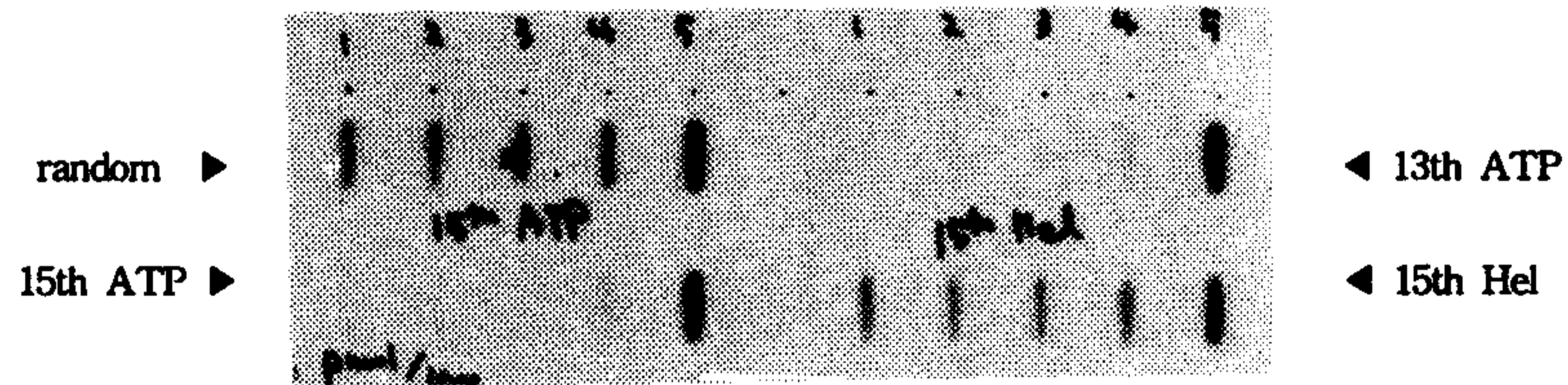
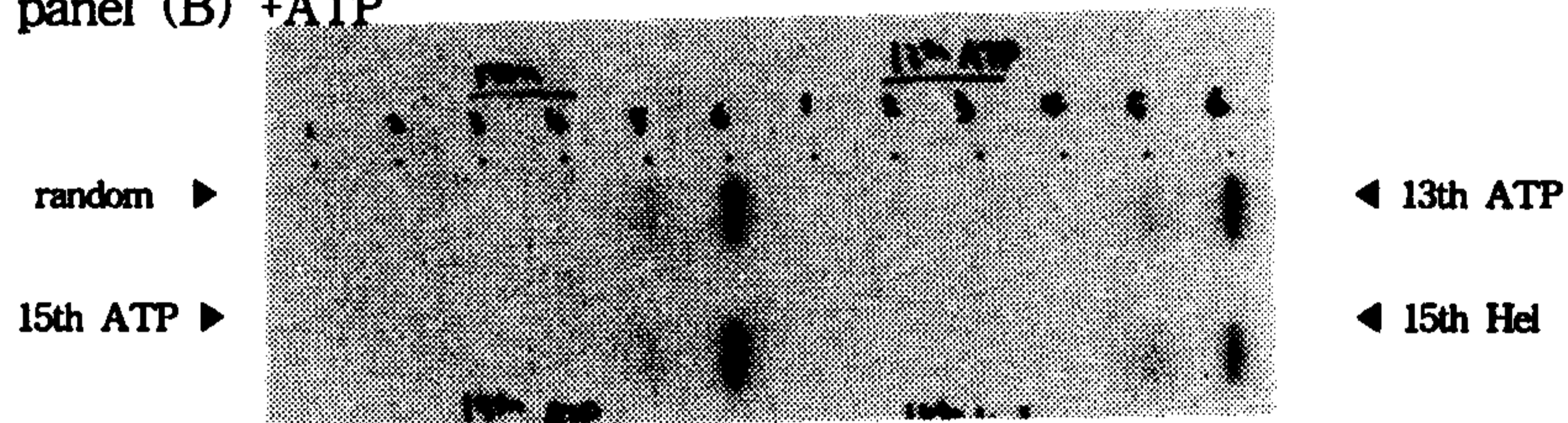


Fig 4. 시간의 변화에 따른 random RNA의 gel mobility shift assay. 각 lane에 사용된 helicase는 0.3 pmol, [γ - 32 P] ATP로 5' label된 random RNA 0.2 pmol이다.

panel (A) -ATP



panel (B) +ATP



slot	1	2	3	4	5	6
helicase (fmol)	0	0.3	3	30	300	300 (-ATP)

Fig 5. Filter binding assay. panel (A)는 (-)ATP에서 panel (B)는 (+)ATP에서 assay하였다. [γ - 32 P] ATP로 5' label된 각 RNA는 0.2 pmol, cold random RNA는 1.68 pmol, BSA는 50 μ g 이다. Helicase는 slot마다 0, 0.3, 3, 30, 300 fmol씩 증가시켰다. 그리고, 반응은 37°C에서 15분 실행되었다. 그리고 panel (B)의 6번 slot은 ATP를 제거하였다.

random이나 'Hel' pool, 'ATP' pool이 모두 BSA에 결합하지 않는다. 이는 (+) ATP에서 5 mM ATP가 BSA에 대한 RNA의 non-specific binding을 저해하기 때문이라고 추정된다. 그리고, high salt buffer [20 mM Tris-HCl pH7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂]에서 21번째 'ATP' pool이 random pool보다 60배 가량 잘 결합한다 (Fig. 6).

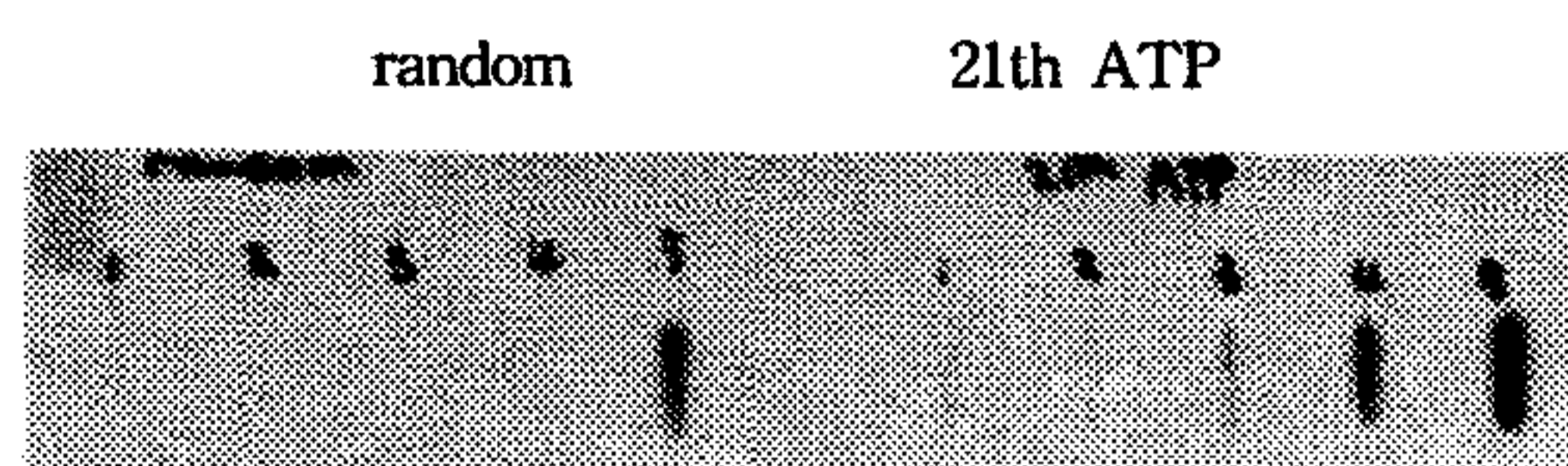
5. helicase의 활성

Substrate인 두 가닥 RNA가 완전히 풀리기 위해서는 RNA: helicase = 1: 3이상이어야 한다. 이때 소요되는 시간이 1분이든 60분이든 생성비에는 변화가 없다. 또한, 19번째 'ATP' pool을 helicase 반응시에 넣어주면, unwinding 반응이 저해된다. 하지만, random pool만 첨가하여도 반응이 저해되며 이와 비교하면 큰 차가 없다 (data 생략). Helicase는 ATP존재 여부에 따라 반응에 영향을 받기 때문에 ATP 첨가 순서에 따른 반응비의 변화를 관찰하였다. Helicase를 ATP와 substrate 두 가닥 RNA에 동시 첨가시켜 시간별 반응을 진행한 것에 비해, helicase와 ATP를 미리 시간별로 반응시킨 후 substrate를 첨가한 것에서 활성의 감소가 관찰되었다 (Fig. 7).

6. 염기 서열 결정

15번째 'Hel' pool과 19번째 'ATP', 25번째 'ATP' pool을 sequencing하였다. 'Hel' pool은 한 가지의 clone만 관찰되었고, 'ATP' pool은 C가 부족하고 G, T가 반복되는 염기가 얻어졌다 (Fig. 8).

panel (A)



slot	1	2	3	4	5
helicase (fmol)	0	0.3	3	30	300

panel (B)

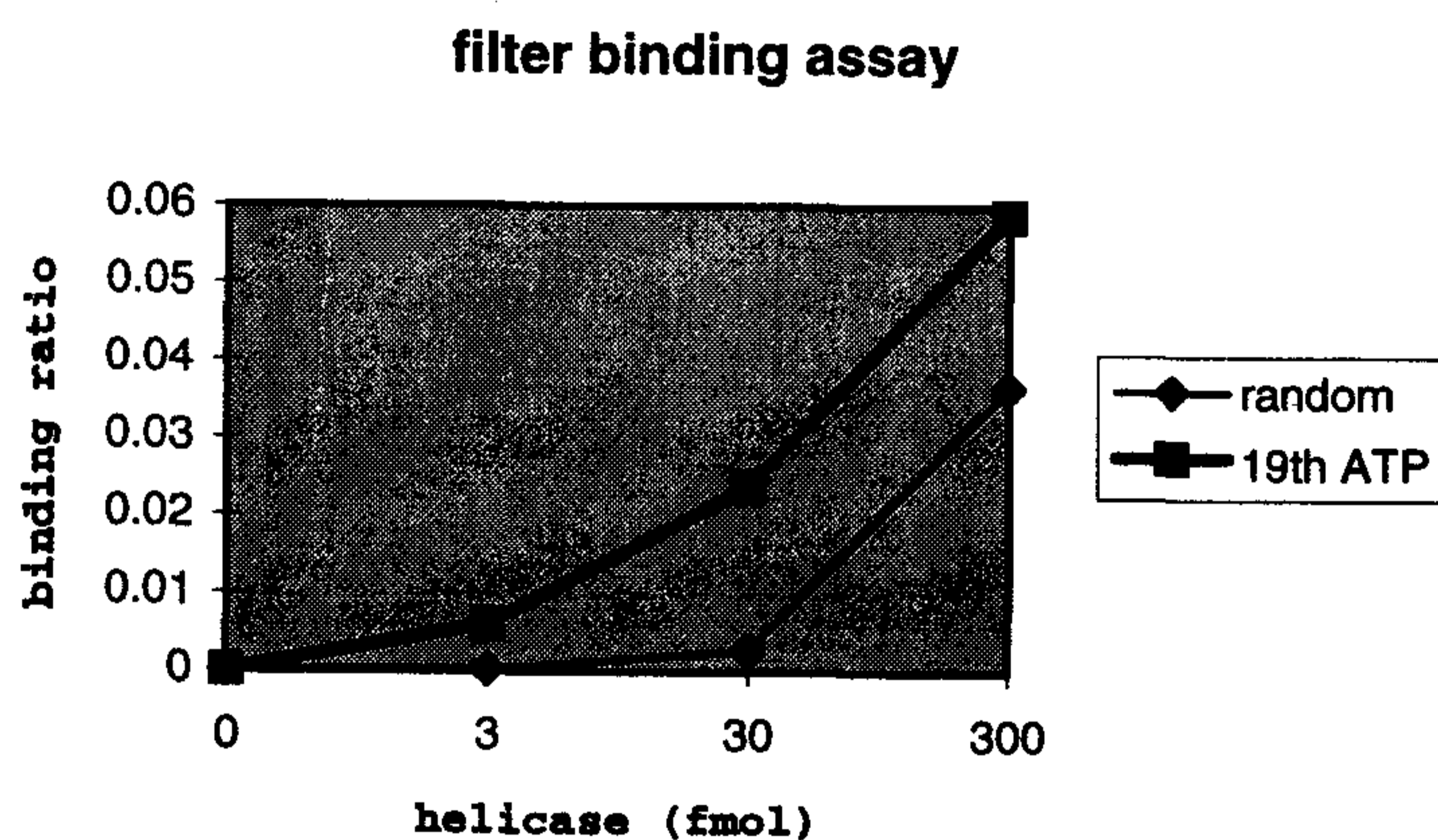


Fig 6. Filter binding assay. panel (A) [γ - 32 P] ATP로 5' label된 각 RNA는 0.1 pmol, cold random RNA는 1.68 pmol, BSA는 10 μ g 이다. Helicase는 slot마다 0, 0, 3, 30, 300 fmol씩 증가시켰다. 그리고, 반응은 37°C High salt buffer에서 실행되었다. panel (B) phosphor imager로 scanning하여 band의 진하기를 수치화 하였다.

→ 는 시간의 경과 (분)		↑ 5 min helicase → ATP + RNA				↑ 5 min helicase + ATP → RNA				helicase + ATP + RNA →			
-NS	Δ	0 (min)	5	15	30	0	5	15	30	0	5	15	30
lane1	lane2	lane3	lane4	lane5	lane6	lane7	lane8	lane9	lane10	lane11	lane12	lane13	lane14

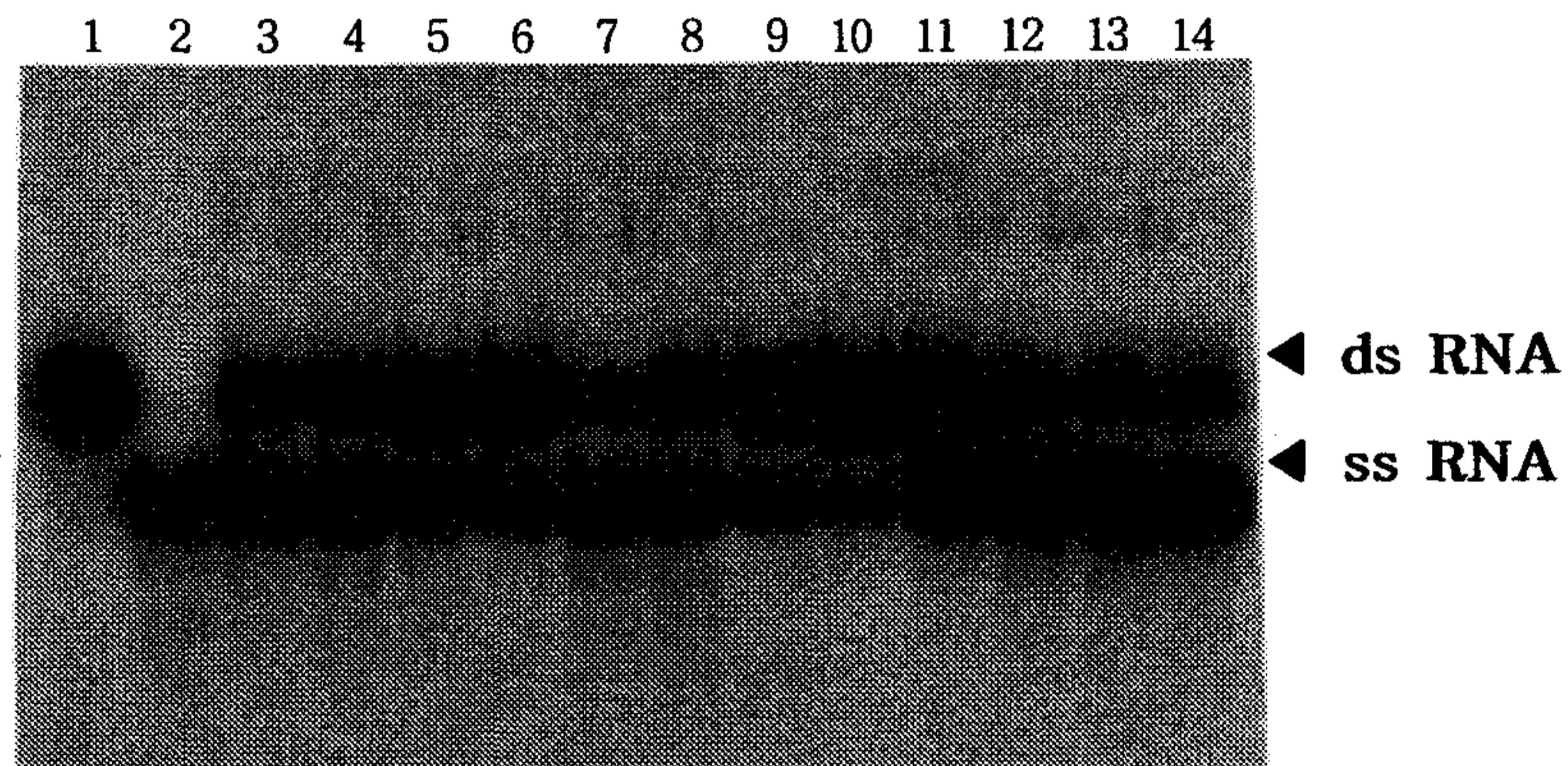


Fig 7. Helicase의 활성 assay. 5 mM ATP helicase buffer에서 [α - 32 P] CTP로 internal label된 두 가닥 RNA는 0.1 pmol, helicase는 0.15 pmol 사용하였다.

pHel 15-2, 5

CCCCA CTGCG CAGGA AAGGA AATAC GCACA TCAAC AATCC AT

pATP 19-2

TGACT CCGCC TCTGT AGTGT GTAGT TGAAA TATTT TGGGG AT

pATP 19-2, 9, 15

GGGAA TGGGA TGTGG GTTAT GGGAT TGCAC AGGTA GTGGA GT

pATP 19-3

GCGGA GATAG TAGAG TCAGT GTGTG TATAA TGGCT GGGGG AG

pATP 19-4

GCNGA GATAA CGAGA GATAT ATAGT GATGT GAAGC NNGGG AA

pATP19-5, 8

CGGCC TCCCC TTTAC AGTTG TTGGA TATTA GTAGG AACTG GG

pATP19-6

TCGTG TAGTG TAGTA GTAGT GTAGT GTTAG TGTTA TAAGG GGGTA ATG

pATP19-7

ATGAG TTAGG GCAAG ATATG TTGTA GATAG AATGA GTGGG AG

pATP19-11

GTGTT ATAAG TGTAG TGAAG ATATT AGGGG GATGA TATAC GG

pATP19-12

TNNCT CCGAG GGAAT TGTAG GTGTN TTNTC ATGAG GTTAG AG

pATP19-13

AGNCT CCGAG GGAAT TCGCT AGCGT GTATT GCATT ATAAG GT

pATP19-14

TGTAA GAGTA GAGAT GTATG CGTAG TAGTA TTAGC ATNGG GG

pATP25-1, 2, 6, 8

TGAGA TGTAG TTATT GTTAT GAAGT AGAGT AGGAG GAGGA GG

pATP25-3

AGGTG TATGT AGCAT GTTGT GAATA GTTAT GAATC GGGGG AGT

pATP25-5

AAGAG ATATA GGCGT AAGATTCGAA AGGAG GAGGA GGATA GA

Fig 8. 염기 서열 분석. 15번째 'Hel' pool, 19번째 'ATP' pool, 25번째 'ATP' pool의 clone을 sequencing하였다. 밑줄 친 부분은 APT aptamer와 homology가 있는 부분이다.

제 4 절 고찰

본 실험은 두 가지 방향으로 진행되었다. 하나는, helicase의 RNA aptamer를 선별하는 것이다. 두 번째는, helicase의 기능을 속도론적이고 분자생물학적으로 조사하는 것이다. 'Hel' pool은 sequencing 결과 기존의 ATP binding aptamer와 유사한 염기 서열을 포함하고 있음이 관찰되었다. 하지만, random RNA와 비교하여 helicase에 큰 결합력을 갖지 않는다. 이는 (-) ATP에서 RNA-helicase complex가 다시 분리되지 않아서 많은 copy의 RNA가 확률적 선별의 대상이 되었을 것이다. 또는, (-)ATP에서 helicase에 대한 최적의 진화된 RNA는 random 정도의 친화력을 가지며 다만 구조적인 상보성만이 선별의 조건으로 작용할 가능성도 있다.

21번째 'ATP' pool RNA는 helicase를 RNA의 1/100~1/10 사용하여 filter binding assay하면, random RNA보다 60~10배 가량 결합을 잘한다. 하지만, 21번째 'ATP' pool은 전선별 단계를 거치지 않았다. 그러므로 전선별을 거친 25번째 'ATP' RNA로 다시 filter binding assay나 gel mobility shift assay를 하면, 보다 높은 결합력의 RNA가 기대된다.

한편, helicase의 메커니즘을 살펴보자. (+)ATP에서 helicase에 RNA가 결합한 후 시간이 경과함에 따라 점진적으로 분리된다. 또한 (-)ATP에서 'ATP' pool이 BSA에 non-specific하게 결합하지 않는다는 점을 고려해볼 때, 선별 RNA와 helicase의 성격을 요약할 수 있다.

첫째, 'ATP' pool은 BSA가 아니라 helicase specific하게 결합한다.

둘째, helicase를 5 mM ATP와 미리 반응시키고 RNA를 첨가하면 결합성이 줄어든다는 점을 추정해 볼 때, helicase에는 ATP 결합부위와 RNA 결합부위가 있는데 이 자리에 대한 ATP와 RNA의 상호 경쟁이 존재할 것이다. 이 가

정은 helicase의 활성 조사에서도 증명되었다.

셋째, 시간의 경과와 반응성 그리고 결합성의 연관성을 관찰하면 다음과 같다. 시간이 경과할수록 RNA-helicase complex가 분리되고 두 가닥 RNA가 외가닥으로 풀어진다. Unwinding 반응은 5분 이내에 완결되지만, RNA-helicase complex는 5분이 지나도 남아있다. 이는 RNA가 helicase와 결합이 순간적으로 형성되어 RNA의 unwinding이 일어난 후에도 일부 풀린 RNA에 helicase가 결합되어있음을 알 수 있다.

또한, RNA: helicase = 1: 5.7에서 완전히 complex가 형성되는 것으로 보아 HCV NS3 helicase는 polymer로 존재함을 추정할 수 있다. 다른 helicase의 연구처럼 정확한 monomer의 수를 알기 위해서는 microscopic study가 필요할 것이다 (3).

앞으로의 연구는 전선별을 거친 25번째 'ATP' pool의 보다 많은 염기 서열 분석, RNA 구조 확인, helicase의 활성 억제 및 활용 그리고 helicase의 메커니즘 해석에 중점을 둘 것이다. 이러한 일련의 연구 결과는 HCV의 life cycle을 상세히 밝히고 바이러스 성장 억제에 큰 발전을 기여할 것이다. 이로 인해, HCV의 숙주인 인체의 대사 물질 조절에도 분자생물학적, 생화학적 응용성을 제공할 것이다.

제 5 절 참고 문헌

1. Kim, D. W. *et al. Biochem. Biophys. Res. Comn.* 215, 160-166 (1995)
2. Schneider, D., Tuerk, C., Gold, L. *J. Mol. Biol.* 228, 862-869 (1992)
3. Egelman, E. H. *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3869-3873 (1995)