

과제번호: 98-N1-06-01-A-04

GOVP 12015830

과제명: 간염바이러스 단백질의 구조분석 및 관련연구

Structural Analysis and Related Research  
on Hepatitis B Virus Proteins

주관연구기관: 서울대학교

과학기술부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “간염바이러스 단백질의 구조분석 및 관련연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2000. 9.

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 서세원

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 정구홍

## 요 약 문

### I. 제 목

간염바이러스 단백질의 구조분석 및 관련연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요

B형 간염바이러스 단백질의 구조 연구를 통하여 HBV의 복제 기작을 이해함으로써 간염치료제 개발에 공헌하는 것이 최종 목표이다. 이를 달성하기 위하여 *E. coli*와 eukaryotic cell에서 발현시킨 활성형의 HBV polymerase의 terminal protein (TP) domain을 대량 발현하여 정제하고 삼차원 구조를 규명하려고 한다. 복제개시를 위한 primer로써의 terminal protein 기능은 HBV 복제에 있어서 매우 중요하다. 복제의 시작점에서 terminal protein domain이 사용되기 때문에 이 부분의 구조적 및 기능적 연구는 HBV의 이해 및 치료제 개발에 필수적이다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

- Prokaryotic expression system에서의 HBV terminal protein domain 단백질 발현: Terminal protein domain expression vector 제조, 융합된 terminal protein domain의 발현과 분리, HBV terminal protein domain에 대한 polyclonal antibody의 생산
- Eukaryotic expression system에서의 HBV terminal protein domain 단백질 발현 및 순수분리 system 구축: Insect cell에서 baculovirus 발현 system을 이용한 terminal protein 발현, 포유동물세포에서의 발현, 순수 분리 system 구축
- Ion exchange chromatography, gel filtration의 방법으로 발현한 단백질을 순수 분리, 결정화
- X-선 회절에 의한 삼차원 구조 규명

### IV. 연구개발결과

- Transcomplementation이 가능한  $\Delta$ TP를 발현할 수 있는 recombinant baculovirus 제조

- 다양한 B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 제조와 발현조건 탐색. 총 55종 이상의 발현 벡터를 제조하여 발현을 조사하였다. BL21(DE3)등의 cell에서 37-18도 사이의 온도에서 단백질이 inclusion body로 형성되었다
- B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 Refolding과 결정화 실험
- 중합효소내의 TP domain의 위치 확인

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- In vitro priming assay를 앞으로 priming inhibitor screening system을 확립하는데 활용
- cell-free expression system, insect cell 또는 drosophila cell expression system 등 더 다양한 발현 시스템을 사용하는 추가적 연구에 활용

## S U M M A R Y

### I. Project Title

Structural characterization and related studies on the hepatitis virus protein

### II. Goal of the Project and the Need for the Project

The final goal is to contribute to the development of therapeutics for hepatitis through understanding the replication mechanism of human hepatitis virus B. In order to achieve the goal, attempts will be made to express functionally active HBV polymerase terminal protein domain and to crystallize it for structure determination. The role of TP as a primer in the initiation of replication is a critical step. Thus structural and functional studies on TP are important.

### III. Contents and Scope of the Research

- Establishing prokaryotic expression systems for expressing HBV terminal protein domains: preparation of various expression vectors for terminal protein domain, expression and purification of fused terminal protein domain, production of polyclonal antibody against HBV terminal protein domain
- Establishing eukaryotic expression systems for expressing HBV terminal protein domain: expressing TP in insect cells using the baculovirus vector system, establishing the expression system in mammalian cells, establishing purification systems
- Purification of the expressed protein by ion exchange chromatography, gel filtration and crystallization screening
- Determination of three-dimensional structure by X-ray diffraction

### IV. Results of the Research

- Preparation of a recombinant baculovirus vector for expressing  $\Delta$ TP, which is capable of transcomplementation

- Preparation of a variety of expression vectors for expressing HBV terminal protein domains and screening of the expression conditions. Over 55 kinds of expression vectors were prepared and expression conditions were screened. The expressed protein formed an inclusion body at 37-18°C using BL21(DE3) and other E. coli cells.
- Refolding of HBV terminal protein domains and crystallization screening
- Establishing the location of TP domain within the HBV polymerase

#### V. Plan for Utilization of the Results

- In vitro priming assay will be utilized to establish the priming inhibitor screening system.
- The results will be useful for further investigation for expression using cell-free expression system, insect cell, or drosophila cell expression systems.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction.....	8
Chapter 2. Worldwide Technology Developments.....	11
Chapter 3. Research and Development Project.....	13
Chapter 4. Degree of Achievement and Contributions.....	42
Chapter 5. Plan for Utilizing the Results.....	44
Chapter 6. References.....	45

## 목 차

제 1 장 서론 .....	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	13
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	42
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	44
제 6 장 참고문헌 .....	45



## 제 1 장 서론

Hepatitis B virus(B형 간염 바이러스, HBV)는 1970년 Dane에 의하여 그 존재가 밝혀진 이후 간염의 직접적인 원인이 된다는 사실이 밝혀졌으며 (Blumberg, B.S., 1984), life cycle을 비롯한 여러 분자생물학적 특징들이 보고되었다. HBV particle이 간세포 내로 들어오면 세포내의 RNA polymerase 활성을 이용하여 3.2 kb 의 DNA 주형으로부터 약 3.5 kb의 mRNA를 만들어내게 된다. 그리고 virus내에 있던 HBV polymerase의 역전사효소의 활성에 의해 새로운 DNA 주형을 만들어낸다. 이러한 과정을 거치면 하나의 virus particle이 세포 내에 감염되었을 때에 200-300개의 새로운 DNA genome이 생겨나고 이들로부터 다량의 바이러스 단백질이 발현된다.

HBV의 위험성은 서구에 비해서 감염률이 높은 우리 나라, 중국, 일본을 포함하는 동남아시아의 경우에 크다. 또한 HBV의 감염의 결과 대부분의 사람의 경우에 치유가 되나 만성간염의 환자의 경우에는 지방간 및 간암이 유발되는 확률이 아주 높기에 HBV의 위험성은 크다. 특히 만성간염환자의 치료법의 개발은 만성간염이 간암으로 진행되는 것을 막을 수 있는 지름길이기 때문에 아주 중요한 과제이다.

HBV polymerase는 하나의 효소가 RNA-dependent DNA polymerase, DNA-dependent DNA polymerase, RNase H 세 가지의 활성을 가지고 있고, RNA genome의 encapsidation에도 관여하는 등 HBV 복제에 중요한 기능을 하는 것으로 보고되어 HBV 치료제 개발에 있어서 주요목표가 될 수 있을 것으로 기대되나, HBV cell line에서 분리할 수 있는 HBV polymerase의 양이 매우 적어 이를 이용하는 실험에는 한계가 있다.

B형 간염 바이러스 복제는 최초 pre-genomic RNA의 5'-ε 부위를 polymerase가 인지하고, 자기자신의 N-terminal 지역(terminal protein domain)을 primer로 사용하여, 4-6 nt를 polymerase domain의 도움을 받아 자신의 단백질에 결합시키고 합성한다. 이렇게 합성된 DNA조각은 3' 지역의 DR1(direct repeat I) 부위로 이동을 하며 새로이 (-)strand genomic DNA를 합성한다. 이 결과로 RNA-DNA hybrid가 생성되는데, RNase H활성에 의해서 template RNA가 제거되어야만 계속적으로 역전사효소가 작용을 할 수 있으므로 RNase H 활성은 역전사효소의 필수적인 기능이다. 그리고 다시 한번의 RNA 조각의 translocation이 있는데 이것은 5'지역의 RNA 주형조각의 일부가 새로이 합성된 (-)strand DNA로 전이하여 (+) strand DNA를 합성한다. 이와 같은 방법으로 HBV는 복제를 한다. HBV 복제 개시 시에

reverse transcriptase를 사용하는 HIV와 같이 tRNA를 primer로 사용하지 않고 자기 자신을 primer로 사용하기 때문에 복제가 거의 완성된 후에도 HBV polymerase의 단백질에 DNA가 공유결합으로 부착되어 있다. 이러한 복제개시를 위한 primer로써의 terminal protein 기능은 HBV 복제에 있어서 매우 중요하다. 복제의 시작점에서 terminal protein domain이 사용되기 때문에 이 부분의 구조적 및 기능적 연구는 HBV의 이해 및 치료제 개발에 필수적이다.

DNA 복제 시에 단백질의 serine, threonine, tyrosine residue의 OH기를 primer로 사용하여 합성되는 DNA조각에 선택적으로 공유결합을 할 수 있다. 이와 같이 단백질이 primer로 작용하는 경우는 animal virus 인 adenovirus 와 *B. subtilis* phage에서 알려져 있다. 이 protein primer가 genome의 끝에 결합되어 있기 때문에 terminal protein이라고 불린다. 이러한 기작은 eukaryotic cell과 prokaryotic cell에서 동일한 기작으로 작동된다. 또한 protein priming mechanism은 복제의 조절의 기점이기 때문에, protein priming mechanism을 사용하는 animal virus에서의 terminal protein의 연구는 virus의 치료제 개발에 기초자료로 사용될 수 있다.

Terminal protein domain의 DNA 부착 아미노산인 63번째 tyrosine의 mutant는 복제의 시작인 priming이 되지 않았다. 이러한 사실은 바이러스의 증식에 terminal protein의 기능은 필수적임을 보인다. HBV 복제 기작에 대한 정확한 이해를 위해서는, HBV 중합효소의 순수 분리와 발현이 요구된다 (Chang, L. J. et al., 1990). 하지만 HBV 중합효소는 바이러스 입자와 너무 강하게 결합되어 있어 (Radziwill, G. et al., 1988) 그 분리가 어려워 성공한 예가 없다. 또한 in vitro translation system을 사용한 많은 실험들이 있기는 하지만 순수분리의 어려움이 있어 구조 기능 연구에 어려움이 많다. 여러 실험실에서 heterogeneous expression system을 이용하여 HBV polymerase를 발현하는 것을 시도하였으나, polymerase 활성을 가진 단백질을 분리하지 못하였으나 서울대학교 정구홍 교수 실험실에서는 활성을 지닌 polymerase를 발현 및 분리하는 데에 성공하였다. 그리고 이것으로 in vitro assay system을 구축하였으나, 그러나 그 양이 매우 적어서 구조를 규명하는데 어려움이 있었다. 그래서 각 기능적 domain을 발현, 분리하여 대량발현의 가능성을 조사하고 각 기능적 domain의 결정을 제조하여 HBV polymerase의 전체 구조를 규명할 필요가 높다.

B형 간염바이러스 단백질의 구조 연구를 통하여 HBV의 복제 기작을 이해함으로써 간염치료제 개발에 공헌하는 것이 최종 목표이다. 이를 달성하기 위하여 *E. coli*와 eukaryotic cell에서 발현시킨 활성형의 HBV polymerase의 terminal protein (TP) domain을 대량 발현하여 정제하고 삼차원 구조를 규명하려고 한다. 최종목표

에 다다르기 위해 다음과 같이 연구 개발 목표를 정하였다.

① 안정하고 충분한 양의 활성형 HBV polymerase의 TP domain을 대량 발현하고 정제하는 시스템을 확립

② X-선 회절 실험에 충분히 적합한 좋은 질의 결정을 확보

③ HBV polymerase의 TP domain에 대한 삼차원 구조를 밝히고 특히 억제제와의 상호작용 부위에 대하여 자세히 밝힌다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1970년 Dane에 의하여 Hepatitis B virus (HBV)의 존재가 최초로 확인됨.
- 그 이후 HBV가 간염의 직접적인 원인이 된다는 사실이 밝혀짐.
- 1992년 서울대 노현모 교수팀에 의하여 HBV를 생산하는 사람 간암세포 균주가 개발됨.
- 1992년 국내 KIST유전공학연구소 (현 생명공학 연구소)의 이영익 박사팀 및 서울대 노현모 교수팀에 의하여 X-gene 유전자가 클로닝됨.
- 1994년 서울대 노현모 교수팀에 의하여 HBV의 DNA중합효소 활성 시험 방법이 확립됨.
- 1994년 서울대 정구홍 교수팀과 동화약품의 공동 연구에 의하여 HBV의 중합효소 다량 발현 성공.
- 서울대 정구홍교수 연구실에서는 세계 최초로 활성을 지닌 사람의 B형 간염 바이러스 중합효소를 E. coli에서 발현시켜 분리해냈고 (Lee et al., 1993), 중합효소의 특성을 규명하여 최적조건하에서의 간염 바이러스 중합효소의 in vitro assay system을 확립하였다. (Jeong et al., 1994)
- 지금까지 사람의 B형 간염 바이러스에 대한 연구는 백신생산을 위한 표면항원 (S-gene)에 대한 연구와 전사조절에 관련된 X-gene의 연구에만 비교적 활발하게 이루어졌다. 그러나 실제적으로 B형 간염 치료제 개발에 중요한 target이 되는 중합효소에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 형편이다. 이는 사람의 B형 간염 바이러스 중합효소가 바이러스 입자와 너무 강하게 결합되어 있어 (Ranziwill et al., 1988) 그 분리가 어려울 뿐만 아니라 활성을 지닌 중합효소의 발현에 성공한 예가 없었기 때문이다.
- 현재 B형 간염의 치료제는 없으며, 이에 대한 유일한 대책은 예방 백신을 맞는 것이다.
- 현재 B형 간염 치료제 개발을 위하여 국내에서는 유전자의 확보 및 효소 활성

측정의 수준에 머물고 있으며, HBV의 효소구조에 대한 연구는 거의 수행이 되지 않고 있음. 따라서 구조를 이용한 신약 개발이 불가능한 실정임.

- 보다 효과적이고 신속하게 감염치료제를 개발하려면 단백질 구조 정보가 필요하나 현재 신약개발 표적이 될 B형 바이러스 단백질의 구조는 전혀 알려져 있지 않고 있음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 3.1 연구개발 방법론

X-선 회절에 의한 삼차원 구조 규명에 필요한 단결정(single crystal)을 얻기 위해서는 상당한 양의 효소를 발현하여, 순수하게 분리 정제해야 하며, 결정 성장의 조건이 단백질마다 다양하므로 많은 실험조건을 조사할 필요가 있다. 0.1 내지 0.3 mm 정도 크기의 단결정을 기를 수 있는 조건이 확립되면 결정의 세포 상수들과 공간군에 대한 자료를 확보한다. 결정이 X-선을 충분히 잘 회절시키면 CuK $\alpha$  X-선 (1.54 Å 파장)이나 방사광 장치에서 발생하는 X-선을 써서 삼차원 세기자료를 수집한다. 위상 문제는 이미 밝혀진 비슷한 구조를 이용할 수 없으므로 중금속 유도체를 제조하여 MIR (Multiple Isomorphous Replacement) 방법으로 해결하거나, MAD (Multiwavelength Anomalous Diffraction)법에 의하여 해결한다.

(1) Prokaryotic expression system에서의 HBV terminal protein domain 단백질 발현

#### ① Terminal protein domain expression vector 제조

HBV polymerase의 terminal protein domain을 PCR로 amplify하여 open reading frame을 맞추어 MBP(maltose binding protein), GST(glutathion S-transferase), CBP(calmodulin binding peptide), C-myc tag, thioredoxin 등이 fusion 될 수 있는 fusion vector에 옮긴다. 이 expression vector는 tac promoter를 이용하여 *E. coli*의 세포질내로 발현된 단백질을 축적하게 된다.

#### ② 융합된 terminal protein domain의 발현과 분리

융합된 terminal protein domain을 IPTG를 inducer로 이용하여 *E. coli*에서 대량 발현시키고 affinity chromatography를 이용하여 순수분리한다. 분리된 terminal protein domain 융합단백질에 Factor Xa 또는 thrombin protease를 처리하여 fusion partner와 terminal protein domain을 서로 분리시킨 후, 다시 affinity column을 통과시킴으로써 잘려진 fusion partner를 제거하여 순수한 HBV terminal protein domain을 얻는다.

#### ③ 분리된 HBV terminal protein domain의 확인

Fusion protein의 발현여부를 SDS/PAGE와 각 fusion partner에 대한 antiserum을 이용한 Western blot으로 확인하고, fusion 부위를 잘라낸 후 정제된 HBV terminal protein domain의 분자량 및 순도를 SDS/PAGE를 통해서 한다.

#### ④ HBV terminal protein domain에 대한 polyclonal antibody의 생산

정제된 terminal protein을 토끼에 주사하여 anti-HBV terminal protein

antiserum을 얻는다.

## (2) Eukaryotic expression system에서의 HBV terminal protein domain 단백질 발현 및 순수분리 system 구축

Eukaryotic cell에서 작용하는 단백질을 prokaryotic cell에서 발현하는 경우에 안정성 및 알맞은 folding이 일어나지 않을 수 있고, 또한 glycosylation, phosphorylation과 같은 post-translational modification이 실제와 달라서 단백질의 안정성이 낮아 질 수 있다. eukaryotic cell 발현 system을 사용하여 활성있는 단백질을 얻고자 한다. 또한 prokaryotic cell에서 발현한 단백질의 순도를 높이기 위하여 여러 가지의 chromatography 기법을 사용하고자 한다.

- ① Insect cell에서 baculovirus 발현 system을 이용한 terminal protein 발현
- ② 포유동물세포에서의 발현
- ③ 순수 분리 system 구축

Ion exchange chromatography, gel filtration의 방법으로 순수 분리하도록 한다. 순수도 확인은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 할 것이다. 결정화 실험에 앞서 ultrafiltration 장치를 사용하여 단백질 농도를 필요한 수준 (10 - 20 mg/ml)으로 높인다.

## (3) X-선 회절에 의한 삼차원 구조 규명

### ① 단백질 정제

ion exchange chromatography, gel filtration의 방법으로 순수 분리하도록 한다. 순수도 확인은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 할 것이다. 결정화 실험에 앞서 ultrafiltration 장치를 사용하여 단백질 농도를 필요한 수준 (10 - 20 mg/ml)으로 높인다.

### ② 단백질 결정화 실험

결정화 방법은 흔히 쓰이는 hanging-drop vapor diffusion 방법을 사용하고, 초기 조건 확립을 위해 incomplete factorial 실험 조건과 sparse matrix 조건을 조사한다 (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991). 침전제로는 ammonium sulfate, polyethyleneglycol 8,000 또는 methylpentanediol 등을 쓰려고 하며, 온도는 20°C와 4°C를 조사해 보며, 필요한 경우 seeding 방법도 시도할 것이다.  $\beta$ -octyl glucoside와 여러 중성 세제의 사용도 고려한다 (McPherson et al., 1986).

### ③ 예비 X-선 실험

크기가 약 0.3 내지 0.5 mm 정도인 단결정을 X-선 모세관에 넣어 양끝을 밀폐한 다음 X-선 사진을 찍는다. 우선 X-선을 어느 정도 회절시키는지 알아보며, X-선 사진으로 부터 단위 세포 상수들을 계산해내고, 공간군에 대한 결론을 얻어낸다.

### ④ 중금속 유도체의 제조

비슷한 단백질 삼차원 구조를 이용하여 위상문제가 해결되지 않을 경우 중금속을 이미 기른 결정내의 단백질과 반응시켜 유도체를 만들어야 한다. 단백질의 가장 반응성이 높은 원자단인 시스테인의 -SH와 반응하는 여러 중금속 화합물을 흔히 사용한다. 적절한 반응조건의 확립을 위해 중금속 화합물의 농도, 반응시간등을 변화시키면서, X-선 회절 능력이 크게 감소하지 않도록 유도체를 만들도록 한다. 구체적인 화합물로는  $K_2Pt(CN)_4$ ,  $KAu(CN)_2$ , ethylmercury thiosalicylate,  $K_3IrCl_6$  등 수십여종을 사용해 불려 고 한다.

### ⑤ X-선 세기 자료 수집

회전 음극 X-선 발생장치에서 나오는 X-선 중 흑연 단색광 장치를 써서  $CuK\alpha$  X-선을 골라 세기 자료수집을 한다. X-선 검출장치는 FAST 이차원 검출기를 사용하며, MADNES 프로그램을 써서 세기 자료 수집을 한다 (Messerschmidt & Pflugrath, 1987). 수집한 자료를 Kabsch의 방법에 의해 처리한다 (Kabsch, 1988).

### ⑥ 위상문제 해결

알아내고자 하는 단백질과 아주 비슷한 구조가 이미 밝혀져 있는 경우에는 분자 치환법 (molecular replacement)에 의하여 위상 문제를 해결할 수 있다. 이 방법에서는 fast rotation function을 써서 분자의 orientation을 찾고, translation function, R-factor search, correlation search등의 계산을 통하여 분자의 위치를 찾는다. 이렇게 얻어낸 근사적인 orientation과 위치를 rigid body refinement 또는 R-factor minimization search방법으로 더 정밀하게 한 다음, 원자위치의 정밀화 계산 (refinement)과 모형수정 (model rebuilding)을 한다. 사용하는 프로그램으로는 MERLOT, AMORE, GLRF



and TF 또는 POLARRFN, X-PLOR을 사용한다.

비슷한 구조가 이미 알려져 있지 않은 경우에는 동형 중금속 유도체를 여러개 만들어 multiple isomorphous replacement 방법으로 위상 문제를 해결할 수 있다. 이 방법에서는 difference Patterson synthesis를 해석하거나 직접법에 의해 중금속 원자들의 위치를 찾아내고 이로부터 위상 (phase)을 계산해낸다. 이때 사용하는 프로그램들은 CCP4 Program Package를 사용한다. 위에서 언급한 것 처럼 많은 프로그램들이 사용되는데, 모두 상당한 기억용량과 계산시간을 요구한다.

#### ⑦ 전자밀도지도 해석

위상문제를 해결하면 Fourier synthesis를 하여 전자밀도 지도를 계산하고, CHAIN, O 또는 QUANTA/CHARMN과 같은 프로그램을 사용하여 단백질의 모형을 만든다 (Jones et al., 1991). 초기모형에서의 원자 위치 오차를 줄이기 위하여 정밀화 계산을 하고, 다시 (2Fo-Fc) map등을 계산하여 모형을 수정 보완한다.

#### ⑧ 정밀화 계산 및 분자 모형 계산

초기모형에서의 원자위치의 오차를 줄여주기 위하여 최소자승법 및 molecular dynamics에 의한 정밀화 계산을 한다. 사용하는 프로그램은 X-PLOR나 TNT 또는 SHELLX93, PROLSQ이며, 정밀화 계산 및 모형 수정을 여러차례 반복하여 낮은 값의 R-factor와 좋은 stereochemistry를 가지는 모형을 얻는다. 좋은 모형을 얻기 위해서는 엄청난 계산시간과 기억용량 그리고 디스크용량을 필요로 함. X-선 구조가 밝혀지기 전에는 아미노산 서열로부터 이차구조를 예측할 수 있다. 분자모형의 계산에는 Molecular Simulations사의 Quanta, Charmm과 modeler 프로그램을 사용한다.

## 3.2 연구개발 수행 내용 및 결과

### 가. 연구수행내용

#### 1. 다양한 B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 제조

##### 1) B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain의 선정

B형 간염바이러스 단백질의 중합효소인 P gene은 모두 842개의 아미노산으로 구성되어 있으며 효소의 활성화에 따라서 terminal protein 단백질, spacer, polymerase, RNase H의 네 부분으로 이루어져 있다. terminal protein은 1번 Met 아미노산에서 178번 아미노산이 최소의 domain으로 알려져 있으나, polymerase부분이 시작되는 304번 아미노산까지 포함이 되어도 효소의 활성을 지닌다. 따라서 1번부터 178번 아미노산까지 포함한 벡터뿐만 아니라 polymerase의 일부분이 포함되는 336번 아미노산까지 포함되는 보다 다양한 terminal protein domain을 발현하는 많은 종류의 발현벡터를 제조하였다. 또한 단백질의 분리를 용이하게 하기 위하여 His-Tag을 terminal protein domain의 N 또는 C 말단 한 곳이나 양쪽 끝에 모두 붙여보았다.

#### ① 대장균에서 human hepatitis B virus(HBV) polymerase 의 제조

##### a) pBPH(1~832 a.a.)

pBAD18s를 EcoR I 를 절단하여 fill-in해 ORF를 맞추었다. pBAD18s와 pMPH(pMAL-C<sub>2</sub> vector에 HBV 의 P gene 전체를 넣은것)의 Sac I 과 HindIII site를 절단하고 ligation시켜 pBPH를 cloning하였다.

##### b) pBTP(1~178 a.a.)

pBAD18s를 EcoR I site를 절단하여 fill-in해 ORF를 맞추었다. pBAD18s와 pMTP (pMAL-C<sub>2</sub> vector에 HBV terminal protein domain을 넣은것)의 Sac I 과 HindIII site를 잘라 ligation하여 pBTP를 cloning하였다.

##### c) pBPOL(336~680 a.a.)

pBAD18s의 EcoR I site를 fill-in하고 ORF를 맞추었다. pBAD18s와 pRSET-POL의 Sac I 과 HindIII site를 절단하여 ligation함으로써 pBPOL을 만들었다.

##### d) pCAL-n vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ82 (TP의 앞부

분이 deletion된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

e) pCAL-n vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ262 (spacer 앞부분 조금까지 deletion된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

f) pCAL-n vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ336 (POL-RH domain)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

g) pCAL-n vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ414 (POL domain 앞부분 조금까지 deletion 된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

h) pCAL-n vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ538 (POL domain 뒷부분부터 끝까지)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

i) pET 28 vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ82 (TP의 앞부분이 deletion된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

j) pET 28 vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ262 (spacer 앞부분 조금까지 deletion 된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

k) pET 28 vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ336 (POL-RH domain)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

l) pET 28 vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ414 (POL domain 앞부분 조금까지 deletion 된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

m) pET 28 vector에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ538 (POL domain 뒷부분부터 끝까지)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다 (그림 1).

n) pMAL-C<sub>2</sub> 에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ82 (TP의 앞부분이 deletion된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

o) pMAL-C<sub>2</sub> 에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ262 (spacer 앞부분 조금까지 deletion 된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

p) pMAL-C<sub>2</sub> 에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ336 (POL-RH domain)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

q) pMAL-C<sub>2</sub> 에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ414 (POL domain 앞부분 조금까지 deletion 된 것)를 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

r) pMAL-C<sub>2</sub> 에 N-terminal부터의 deletion mutant Δ538 (POL domain 뒷부분부터 끝까지)을 Sac I 과 HindIII로 넣었다.

s) pMAL-C<sub>2</sub> 에 terminal protein을 Sac I 과 HindIII로 잘라 pMTP를 만들었는데, insert의 앞 부분은 ORF를 맞추기 위해 PCR로 cloning했다.

t) pET 28에 terminal protein (amino acid 178번까지)을 Nde I 과 Xho I 으 로 잘라 넣어 pETP를 만들었다.

② 대장균에서 woodchuck hepatitis B virus(WHBV) polymerase의 제조

a) pEWTP(1~172 a.a)

pCMW82 DNA에서 Sac I 과 Pst I 으로 TP domain을 절단한 후에 pUC119에 넣었다. 새로 생긴 enzyme site를 이용하여 Sac I - HindIII fragment를 pET-28a에 넣었다. ORF를 맞추기 위해서 EcoR I site를 fill-in 하여 pEWTP를 만들었다 (그림2).

b) pBWPOL(425~798 a.a.)

pBWPOL을 만들기 위해 먼저 WHBV P gene을 포함하고 있는 pCMW82 DNA에서 POL-RH 부분을 HindIII 와 Xba I 으로 절단한 후 pBAD 18S에 넣었다. ORF를 맞추기 위해 Sac I site에서 blunt end를 만든 후 self ligation을 시켜 pBWPR을 만들었다. 여기서 다시 RH domain을 deletion시켜 pBWPOL을 완성하였다.

### ③ 대장균에서 duck hepatitis B virus(DHBV) polymerase 의 제조

a) pBDTP(1~210 a.a.)

vector는 pBAD18s의 EcoR I 과 Sma I site를 절단하고 insert는 pSP65DHBV를 EcoR I 과 EcoR V site를 절단하여 ligation시켜 pBDTP를 만들었다. 이것을 EcoR I site를 절단하여 blunt-ends로 만들어 self-ligation하여 ORF를 맞춤으로써 cloning vector를 만들었다.

b) pBDPR(365~836 a.a.)

pBAD18s를 fill-in하여 ORF를 맞춘후 Sma I site를 절단하여 vector를 준비하고 pSP65DHBV의 Xmn I site를 절단하여 blunt-ligation함으로써 pBDPR을 만들었다.

c) pBDPOL(365~783 a.a.)

pBDPR의 Nco I 과 Sal I site를 절단하여 RH부분을 deletion시키고 fill-in하여 self-ligation 시킴으로써 pBDPOL을 만들었다.

c) pBAD-P(1~832 a.a.)

pBAD18s를 EcoR I 를 절단하여 fill-in해 ORF를 맞추었다. pBAD18s와 pMPH의 Sac I 과 HindIII site를 절단하고 ligation시켜 pBAD-P를 cloning 하였다.

d) pBAD-TP(1~178 a.a.)

pBAD18s를 EcoR I site를 절단하여 fill-in해 ORF를 맞추었다. pBAD18s와 pMAL-TP의 Sac I 과 HindIII site를 잘라 ligation하여 pBAD-TP를 cloning하였다.

e) pBAD-pol(336~680 a.a.)

pBAD18s의 EcoR I site를 fill-in하고 ORF를 맞추어 pBAD18s와 pRSET-PP의 Sac I 과 HindIII site를 절단하여 ligation함으로써 pBAD-pol을 만들었다.

f) pBAD-RH (680~832 a.a.)

pBAD18s를 EcoR I site를 절단해 fill-in을 통해 ORF를 맞추고 pBAD18s와 pMRH의 Sac I 과 HindIII site를 잘라 ligation하여 pBAD-RH를 만들었다.

## 2) 다양한 B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 발현

### ① E. coli에서 TP발현과 정제

#### Vector construction & expression

HBV polymerase gene을 포함하고 있는 pMPH vector에서 terminal protein domain만을 PCR을 이용하여 절편을 얻은 후, 이 절편을 발현 vector인 pET28(Novagen co)에 6-Histag하에 cloning하였다. Cloning된 vector는 IPTG에 의해 T7 polymerase의 발현이 유도되는 C43 strain에 transformation 하였다. Transformation을 통하여 얻어진 cell은 LB media에서 overnight 배양한 후, 다시 100 분의 1로 LB media에 접종하여 OD 0.5 - 0.6 사이에서 IPTG 0.5mM이 되도록 첨가하여, T7 polymerase 발현 유도에 의한 TP의 발현이 이루어지도록 하였다. IPTG 첨가 후 4 시간 배양하고 harvest하였다.

#### (1) 1-178번 TP

Expression Vector : pET-28b

His-Tag : N-terminal His-tag

Expression Host : BL21(DE3)

Overexpression되나 inclusion body로 떨어짐

#### (2) 1-182번 TP

Expression Vector : pET-22b

- His-Tag : C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (3) 1-193번 TP  
 Expression Vector : pET-28b and pET-22b  
 His-Tag : N-terminal His-tag or N,C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (4) 1-200번 TP  
 Expression Vector : pET-28b  
 His-Tag : N-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (5) 1-212번 TP  
 Expression Vector : pET-28b and pET-22b  
 His-Tag : N-terminal His-tag or C-terminal His-tag or N,C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3) or B834(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (6) 1-254번 TP  
 Expression Vector : pET-28b and pET-22b  
 His-Tag : N-terminal His-tag or N,C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3) or AD494(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (7) 1-292번 TP  
 Expression Vector : pET-28b and pET-22b  
 His-Tag : N-terminal His-tag or N,C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3) or AD494(DE3)  
 Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐
- (8) 1-336번 TP(Polymerase의 일부분을 포함)  
 Expression Vector : pET-28b and pET-22b  
 His-Tag : N-terminal His-tag or N,C-terminal His-tag  
 Expression Host : BL21(DE3) or AD494(DE3)

Overexpression되거나 inclusion body로 떨어짐

#### (9) pMAL-TP

pMAL-C<sub>2</sub> 에 terminal protein을 Sac I 과 HindIII로 잘라 pMTP를 만들었는데, insert의 앞 부분은 ORF를 맞추기 위해 PCR로 cloning했다. pMTP를 E.coli에 transformation하여 test한 결과 overexpression이 되었는데, 이것은 ampicillin과 함께 접종하고 37° C에서 OD600에 0.5~0.6이 되면 IPTG로 induction을 한다. IPTG의 농도는 최종 농도의 0.5mM이 되도록 하고 이 후 28° C에서 5.5 시간을 키워 harvest한다. Harvest로 얻은 pellet에 lysozyme 과 protease inhibitor를 섞은 buffur를 넣어 -70° C에 얼리고 완전히 얼은 다음 꺼내어 ice에 30분정도 두어 서서히 녹인다. 녹은 단백질들은 끈적끈적한 상태로 되어있는데, 이것을 sonication하여 세포들을 깨준다. 흘려보아 한 방울씩 떨어질때까지 한 후 14000rpm에서 40분 동안 centrifuge를 돌리고, Supernatant를 모아서 amylose column으로 purify 하는데, pMAL vector에서 만들어 지는 maitose binding protein을 이용한 것이다.

Resin을 1X column buffer 10 volume으로 equilibrium 시킨 후 supernatant를 흘려준다. 다시 1X column buffer 7 volume으로 씻어주고, 0.5M maltose solution 3 volume으로 elution한다. 이 결과를 SDS-PAGE로 분석하였다

Terminal protein의 정제

Affinity chromatography

His-TP의 정제:his-tag이 fusion된 단백질이므로 His-bind resin 을 이용하여 metal-chelating chromatography를 수행하였다. histidine은 imidazole과 구조가 유사하여 imidazole로 elution할 수 있으며, 50mM NiSO<sub>4</sub> Buffer로 resin을 charging시키고 1x binding buffer(20mM Tris · Cl 8.0/ 20mM imidazole/20mM NaCl)로 equilibration시킨 후 sample을 binding시켰다. resin의 5배 이상을 wash buffer를 흘려주고 400mM imidazole이 들어있는 elution Buffer로써 elution하였다. flow rate은 3ml/min로 하였으며 resin의 binding capacity를 고려하여 5 l 배양하여 resin bed volume이 30ml이 되게 하였다. buffer와 sample에는 DTT와 같은 reducing agent와 EDTA가 첨가되지 않도록 하였으며 elution 후 1M의 imidazole 이 들어간 buffer로 완전히

제거한 후 strip buffer를 3배 흘려주어 resin을 regeneration 하였다.

#### Gel filtration chromatography

affinity chromatography에서 얻어진 His-TP를 3기압 하에서 stirr system(Gelman)을 사용하여 2ml까지 농축하고 midium pressure system(Bio-rad)을 사용하여 pre-packed superdex 75(pharmacia)로써 gel filtration하였다. 20mM Tris 8.0/ 20mM NaCl/ 1mM DTT/ 1mM EDTA의 buffer로 1ml/min의 유속으로 작동하였으며 fraction size는 1ml/tube로 하였다.

#### Ion exchange chromatography

gel filtration을 거친 His-TP의 fraction을 모아 Mono Q에 injection 하였다.

buffer A (20mM Tris 8.0/ 20mM NaCl/ 1mM DTT/ 1mM EDTA)와 buffer B (20mM Tris 8.0/ 1mM NaCl/ 1mM DTT/ 1mM EDTA)를 buffer B가 0%에서 100%까지 40분간 gradient를 넣어주었으며 유속은 0.5ml/min으로 하였다.

### ② Insect cell에서 HBV polymerase와 $\Delta$ TP의 발현

#### Vector construction & recombinant baculovirus generation

HBV polymerase gene을 포함하는 pMPH vector를 template로 PCR mutagenesis를 이용하여 HBV polymerase의 N-terminal에 FLAG epitope(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)을 coding할 수 있는 sequence를 삽입하였다. 이와 같이 sequence가 삽입된 HBV polymerase의 open reading frame(ORF)과 3' flanking region의 epsilon site를 포함하여 baculovirus virus genome으로 recombination하는 transfer vector인 pFASTBAC1(Gibco co.)에 cloning하여 FLAG-pol  $\epsilon$  vector를 작성하였다.  $\Delta$ TP  $\epsilon$  transfer vector는 PCR을 이용 polymerase ORF의 531 nt까지



deletion한 fragment를 얻어 FLAG-pol  $\epsilon$  vector의 polymerase의 ORF를 제거하고, 이 site로 삽입하여 cloning 하였다. Cloning된 transfer vector는 Bac-to-Bac system을 이용하여 recombinant baculovirus genome을 얻은 후 Sf-9 cell로 calcium phosphate방법을 이용하여 transfection하였다. Transfection 한 후 3 일 후에 배지를 harvest하여 virus stock으로 저장하였다.

### Cells & infection

Sf-9 cell은 FBS가 5% 첨가된 TNM-FH media에서 배양하였다. Recombinant baculovirus의 infection을 위해서 전날 confluency의 50%정도가 되도록 seeding하고, infection은 M.O.I가 2-8 정도로 하여 2 시간 상온에서 infection후 FBS가 2% 첨가된 Grace's media로 갈아주고 후 2 일 후에 cell을 harvest하였다.

### In vitro priming & transcomplementation

FLAG-pol  $\epsilon$ <sup>1)</sup>과  $\Delta$ TP  $\epsilon$ <sup>2)</sup> recombinant baculovirus를 Sf-9 cell에 infection 후 2일 후에 harvest하여 lysis buffer(0.5% NP-40, 5mM DTT, 1mM EDTA in PBS)로 lysis이후 13,000g로 15분간 centrifugation후 supernatant를 M2 immunoaffinity column을 이용하여 purification하였다. 이와 같이 purification한 FLAG-pol은 dNTP(dATP, dGTP, dCTP)를 각각 100  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub>를 10mM로 하고, <sup>32</sup>P로 labeling된 dTTP를 5  $\mu$ Ci(3000Ci/mmol)을 넣어 TN buffer(100mM Tris · Cl pH 7.4, 30mM NaCl)에서 1시간 30°C에서 reaction하였다.  $\Delta$ TP transcomplementation과정은 purification전에 *E. coli* TP 10ug과  $\epsilon$  RNA 10ug을 lysate에 넣어 purification하고, 이후 reaction시 TP protein 500ng과  $\epsilon$  RNA 1ug을 넣어 FLAG-pol과 같은 환경 하에 reaction하였다. Transcomplementation의 다양한 실험은 위 TP와  $\epsilon$  RNA의 다양한 변화에 의하여 실험하였다.

---

1) 이 recombinant baculovirus는 wild type polymerase의 N-termini에 FLAG epitope을 붙인 형태의 polymerase를 발현한다.

2) 이 recombinant baculovirus는 N-temini에서 177개의 아미노산이 삭제된 형태의 mutant type polymerase의 N-termini에 FLAG epitope을 붙인 형태의  $\Delta$ TP를 발현한다.

## 2. B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 Refolding과 결정화 실험

앞에서 다양한 크기의 terminal protein domain들을 만들어서 발현시켜 보았지만 모두 inclusion body형태의 침전으로 생성되므로, 대량으로 얻은 inclusion body를 분리 정제하여서 *in vitro*에서 refolding실험을 수행하였다.

### (1) Inclusion Body의 분리

앞에서 inclusion body로 발현된 TP domain중 178번 TP, 193번 TP, 212번 TP등 3가지 TP domain을 37°C에서 1 L LB로 키운다. O.D. $\approx$ 0.5 부근에서 최종 농도 1 mM이 되도록 IPTG를 넣어서 induction을 시킨다. IPTG로 induction후 4시간 기르고 7,000 r.p.m X 5분으로 cell을 모은다. resuspension buffer 100 ml에 cell을 잘 푼 다음 sonication으로 cell을 완전히 깨뜨린다. 깨어진 cell 혼합물을 18,000 r.p.m. X 30분 정도 원심분리기로 inclusion body를 침전시킨다. inclusion body를 얻고자 할 때는 cell을 완전히 깨뜨리는 것이 매우 중요하므로 위의 과정을 2번 내지 3번을 반복한다. 위에서 얻은 inclusion body를 resuspension buffer에 6 M urea가 들어있는 buffer 20 ml에 넣고 얼음 속에서 1시간 정도 방치하여서 inclusion body를 녹여낸다. 이렇게 얻은 inclusion body도 60%-70%정도 순수하지만 refolding의 효율을 올리기 위해서 6 M urea가 포함되어있는 조건에서 His-bind resin을 이용한 metal chelation chromatography로 분리정제를 하여서 95% 이상의 순도로 inclusion body를 얻었다.

### (2) Refolding

Refolding시 단백질에 들어있는 6 M urea를 빼내면서 단백질이 native상태로 folding이 되도록 하기 위해서 사용하는 방법으로 dialysis와 dilution 방법을 사용하였다. dialysis 방법은 urea의 농도를 6 M -> 4 M -> 2 M -> 0 M순으로 점진적으로 urea의 농도를 빼내거나 한번에 0 M urea buffer에서 dialysis를 할 수 있다. TP domain의 refolding에서는 4 M urea이하로 농도가 내려가면 침전들이 생성되어서 dialysis방법이 유용한 방법이 되지 못했다. 반면 dilution방법은 눈에 보이는 침전들이 생성되지 않아서 TP domain의 refolding방법으로 적합한 것으로 보였다. Refolding buffer에는 단백질이

native로 folding하도록 0.5 M L-Arg과 0.5% N-laurylsarcosine 그리고 disulfide bond의 생성을 위해서 1 mM/0.2 mM GSH/GSSG를 넣어서 만들었다. 먼저 6 M urea에 녹아있는 10 ml의 TP domain 단백질을 90 ml refolding buffer에 1 ml씩 첨가하여서 6 M urea농도를 0.6 M 정도로 낮추었다. ultrafiltration으로 부피를 10 ml 정도로 줄인 다음 urea가 들어있지 않은 refolding buffer로 밤새 dialysis시켜서 urea를 완전히 제거하였다. 다시 L-Arg과 detergent인 N-laurylsarcosine을 제거하기 위해서 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1 M NaCl, 1 mM Zn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, 0.2 M L-Arg buffer에서 dialysis를 수행하였다. ultrafiltration으로 4 ml까지 농축을 한 후 gel filtration chromatography인 Superdex 75 column에서 분리 정제를 하였다. Superdex 75 column에서 각각의 TP domain들은 dimer정도의 크기에서 나오는 것을 확인하였다. gel filtration에서 나온 TP domain들의 refolding여부를 확인하기 위해서 DynaPro-801 Dynamic Light Scattering장비를 이용하여서 monodisperse한 정도를 측정 한 결과는 3가지 TP domain 모두 분자량이 118-187 kDa 정도로 polydisperse하게 나왔다. 이 중 두 가지 시료에 대해서 현재 microcrystal이 생기는 조건의 최적화를 통하여 큰 결정을 얻도록 시도하고 있다.

### 3. 재조합 플라스미드 제조

HBV pol의 in vitro합성을 위하여 6XHis가 tag된 pol 발현 재조합 플라스미드를 만들었다. pMPH로부터 epsilon 3' copy와 pol이 발현되는 부분을 pRSETb(Invitrogen)의 Sac/HindIII부분에 재조합하였다. 이러한 결과로 만들어진 재조합 플라스미드는 T7 RNA 중합효소의 promoter와 6XHis tag를 가지고 있으며 pHIS/POL라고 명명하였다. Mutant들 1-97, 262-336 그리고 1-336은 pHIS/POL(각각 CD212, ND262 그리고 POL)로부터 제한효소(ApaI, XhoI)자리를 fill-in을 통해 frame-shift mutation에 의해 만들었고 이 mutant는 DNA sequencing 방법으로 확인하였다.

pCMV/MBP(CD199)는 T7과 cytomegalovirus(CMV) promoter의 전사 조절 하에 MBP가 HBV pol에 N-terminal에 융합된 단백질을 발현하는 pCMV/MBP POL을 변형하여 만들었으며 in vitro translation과 HepG2 cell 내에서 동시에 발현될 수 있는 플라스미드를 만들었다. pCMV/MBP(CD1-199)은 POL의 첫번째 amino acid에서 199번째에 해당하는 부위에 oligonucleotide를 이용하여 stop codon을 삽입하는 mutagenesis를

하였다. 그리고 변경된 nucleotide sequence를 DNA sequencing으로 확인하였다.

HBV genome 복제를 개시하는 과정에서, 우리는 protein priming step내 POL의 RT domain(아미노산 330-679)의 active site 부위에 위치하여 primer로써 역할을 하는 부분이 TP domain(아미노산 1-199)일 것으로 추측하였고 protein priming후에, TP domain은 전제 POL구조에 active site로부터 release 할 것으로 기대하였다. 이러한 개념은 POL protein의 monoclonal antibody를 이용한 최근 연구에 의해 유추할 수 있다. 그들 연구에 의하면 TP-specific monoclonal antibody는 enzyme 고유 기능에 대해서 TP domain의 구조적인 전환에 중요성을 제안하였고 역전사 과정과 복제 개시인 protein priming을 방해할 수 있음을 나타내었다.

이러한 가설과 사실을 기초로 하여 primer로써 TP domain의 HBV 중합효소 구조상에 상대적인 위치를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 첫째로 중합효소를 발현하고자 하였으나 발현이 어려운 점을 보완하기 위하여 in vitro translation으로 POL및 mutant protein을 얻고자 하였다. POL coding region은 T7 promoter에 의해 조절하기 위해 pRSETb vector에 His-Tag에 in-frame되게 cloning하였다. 둘째로 TP와 상호 작용하는 부분을 찾기 위해서는 TP를 bait로 사용해야 하기 때문에 동위원소가 없는 methionine으로 발현하였고, purify하기 위해서 MBP(maltose binding protein)를 fusion하여 발현하였다.

#### 4. In vitro translation 반응

HIS/POL protein들과 MBP/POL(CD1-199)는 방사능 동위원소로 label되지 않은 methionine과 L-[<sup>35</sup>S] methionine하에서 TNT coupled reticulocyte lysate에 의해 translation 하였다. 반응조건은 [rabbit reticulocyte 25 ml와 reaction buffer 2 ml, T7 RNA polymerase 1 ml, minus methionine(1 mM) 1 ml, <sup>35</sup>S-methionine(10 mCi/ml) 4 ml, ribonuclease inhibitor(40 m/ml) 1 ml, DNA template 1 mg] Promega 회사에서 제공한 지침서에 따라 30°C에서 90분간 반응하였고 반응 부피는 50 ml로 하였다. translation에 대한 종결은 cyclohexamide(최종 농도 20 mg/ml)를 첨가하여 종결하였으며 반응에 대한 product는 15% SDS-PAGE와 autoradiography로 확인하였다(Figure 1).

위와 같이 제조된 construct를 이용하여 각 mutant protein이 생성되는지

확인하기 위하여 Promega사의 TNT-coupled reticulocyte를 이용하여  $^{35}\text{S}$ -methionine의 존재 하에서 50 ml에서 in vitro translation한 후 2 ml 정도를 SDS-PAGE에서 전기영동한 후 gel을 말리고 autoradiography로 확인하였다. 그 결과 모든 in vitro translation product는 예상했던 위치에서 그 product를 확인할 수 있었다(Figure 2).

## 5. Terminal protein에 대한 antibody 생산

pBAD 18s에 HBV의 terminal protein을 cloning한 pBTP가 overexpression이 되었기 때문에, 이것을 이용하여 TP antibody를 만들려고 한다. 그 계획을 써보면 먼저 pBTP를 ampicillin과 함께 접종하고 37° C에서 OD600에 0.5~0.6이 될 때까지 키운후 arabinose 0.3%로 induction 한다. 그다음 계속해서 5시간을 키운후 4000rpm으로 10분간 cell을 down시킨다. Pellet을 lysozyme, protease inhibitor, DTT등을 넣은 buffer에 섞고 -70° C에서 얼린 후 다시 녹여서 sonication으로 cell을 깬다. 그다음 14000rpm에서 40분 동안 centrifuge를 돌리고 거기서 얻은 supernatant를 가지고 prep cell을 한다. prep cell은 SDS-PAGE를 이용해서 crude 안에 있는 protein들을 size 별로 분리해 내는 것인데, mini SDS-PAGE를 할 때와 같은 조성의 gel을 원기둥 모양으로 크게 만든 후 sample buffer를 섞어 끓인 crude를 loading한다. 일정한 Watt로 running시키면 PAGE의 원리대로 작은 size의 protein이 먼저 내려오게 되는데, gel 아래로 빠져나올 때 그것을 pump로 뽑아내어 fraction을 받는다. 100~200번 정도까지 fraction을 받은다음 번호를 10단위로 끊어서 mini gel을 걸어본다. staining, destaining을 거쳐 나온 gel을 보고 생각하는 위치에 나온 fraction number를 찾은 후 그 앞, 뒤 번호들은 차례대로 mini gel을 걸어본다. 그렇게 하여 crude 속에서 원하는 protein을 찾을 수 있게 된다. 이렇게 prep cell로 얻어낸 protein은 concentration으로 부피를 줄이고, antibody를 만드는 과정으로 들어간다. 100 $\mu\text{g}$ 의 antigen에 동일한 부피의 Freund's complete adjuvant를 넣고 강하게 vortex하여 잘 섞는다. 이렇게 만들어진 antigen-adjuvant를 토끼의 두 다리에 주사하고 4~6주 뒤에 새로 준비한 emulsion(100 $\mu\text{g}$ 의 antigen에 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant를 섞은 것)을 다른 다리에 주사한다. 보조 주사를 놓는 4~6주마다 주사하는 다리를 바꿔주고, 보조 주사를 놓고 7~10일이 지나면 20~40 ml의 피를 뽑아 antibody가 생겼는지 알아보았다.

## 6. MBP(maltose binding protein) pull-down assay

MBP/POL(1-199)은 methionine이 없는 상태에서 합성을 하고 나머지 HIS/POL mutant는  $^{35}\text{S}$ -methionine로 labeling하여 합성한 후에 cyclohexamide를 처리하여 translation을 종결하였다. 그 후에 50 ml MBP/POL(1-199)와 50 ml HIS/POL mutant을 1:1로 섞고 binding buffer(50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)로 부피를 1 ml로 맞추고 그 후에 activated amylose resin을 섞고 ice에서 30분간 방치 후에 washing buffer(20mM Tris.Cl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25% Tween-20) 1 ml씩 4회 washing 하고 15% SDS-PAGE에 전기영동한 후 autoradiography로 그 결과를 확인하였다.

우리는 TP에 결합되는 부위를 알아보고자, MBP-TP는 in vitro translation 하고 나머지 mutant는  $^{35}\text{S}$ -methionine으로 labeling한 후에 cycloheximide로 translation을 stop한 후에 1:1로 섞고 binding buffer를 첨가한 후 ice위에서 1시간 동안 incubation하였다. 그 후에 activated amylose resin을 첨가한 후에 다시 30분간 incubation한 후에 washing하고 SDS-PAGE로 전기영동한 후에 autoradiography로 그 결과를 확인하였다. MBP-TP는 HIS/POL serial deletion mutant들에서 N-terminal지역(1-97)과 RNase domain(680-842)부분만이 binding하지 않는 결과를 얻었으며 MBP-TP가 C-terminal deletion mutant 1-212, 1-336, N-terminal deletion mutant 262-842, 414-842, 538-842, 616-842, N, C-terminal deletion mutant 336-680에 binding하는 결과를 얻었다. 이러한 결과로 미루어 MBP-TP는 POL구조의 spacer, RT(reverse transcriptase) domain에 위치함을 제안할 수 있으며 이는 TP가 primer로 작용하려면 RT의 active site에 근접해야 함을 증명하였다. 또한 RNase H(680-842)와 TP(1-97)의 비상호작용성은 priming시에 RNase H의 구조는 TP와는 관련이 없음을 시사한다.

이와 같은 연구로 우리는 TP가 MBP라는 커다란 fusion protein이 존재하는 관계로 POL의 기능에 MBP-TP에 의해 구조적인 변화와 protein priming에 방해할 것으로 기대되어지며 앞으로 TP가 RT domain의 active site 위치를 규명할 수 있는 초석으로 사료된다.

## 나. 연구결과

1. Transcomplementation이 가능한  $\Delta$ TP를 발현할 수 있는 recombinant baculovirus 제조(Figure 3 and 4)

2. 다양한 B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 제조와 발현조건 탐색

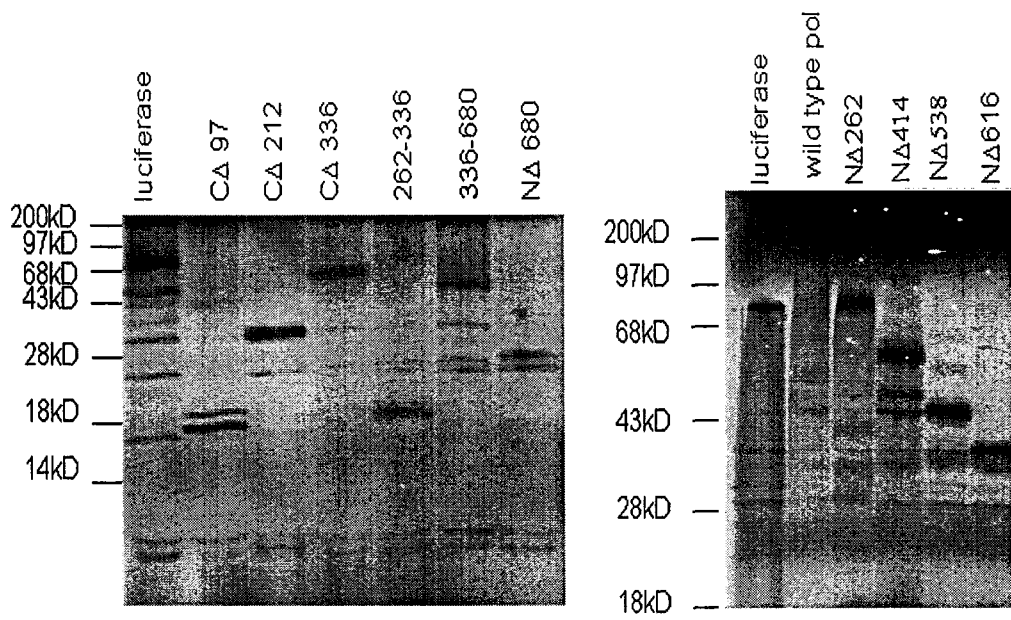
총 15종 이상의 발현 벡터를 제조하여 발현을 조사하였다. BL21(DE3)등의 cell에서 37-18도 사이의 온도에서 단백질이 inclusion body로 형성되었다(Figure 5, 6, 7, 8, 9).

3. B형 간염바이러스 단백질 Terminal Protein Domain들의 Refolding과 결정화 실험

제조합 1-178, 1-193, 1-212번 TP를 refolding하였다. refolding 조건을 상당히 최적화하였다. 결정화 조건의 탐색을 진행하였으나 최적의 조건을 확립하지 못하였다. 아마도 제조합 단백질의 폴딩이 완전하지 않은 것으로 생각된다(Figure 10, 11).

4. 중합효소내의 TP domain의 위치 확인

Hepatitis B virus의 경우, 다른 retrovirus와 유사한 mechanism에도 불구하고 복제 과정 중 다른 initiation mechanism이 이루어지는 것으로 TP domain에 다른 기능이 있을 것으로 기대되며, TP domain의 안정한 protein-protein interaction을 하는 최소한의 위치뿐만 아니라 중합효소 구조의 active site에 위치하는지를 규명하고자 하였다. Hepatitis B virus의 유전자를 발현하기 어려운 단점을 극복하기 위하여 *in vitro* translation으로 Hepatitis B virus 중합효소 유전자와 serial deletion mutant들을 성공적으로 발현하였으며 이를 기초로 하여 MBP pull-down assay를 실행하였다. 이 결과 Hepatitis B virus의 TP domain은 deletion mutant들 중 아미노산 1-97, 680-842까지 binding하지 않음을 알 수 있었으며 이는 hepatitis B virus의 priming 단계에서 TP domain이 TP, RNaseH domain과 관계없이 initiation 일어남을 나타내며, TP domain이 전체 중합효소 구조에서 spacer나 RT domain에 위치함을 알 수 있었다.



In vitro translation products of polymerase mutants

Fig. 1. In vitro translation products of HBV Pol mutants. After translation, 2 $\mu$ l of translation products is analyzed on SDS-PAGE and autoradiography. Description above the panel is the mutant name.



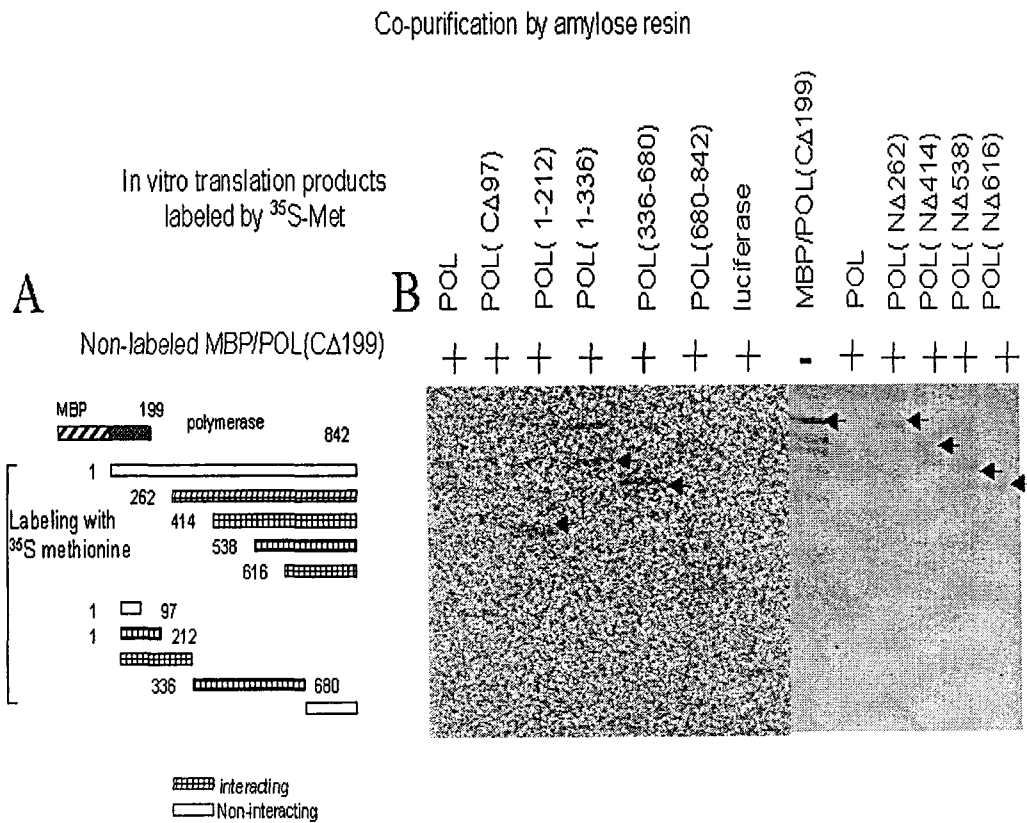
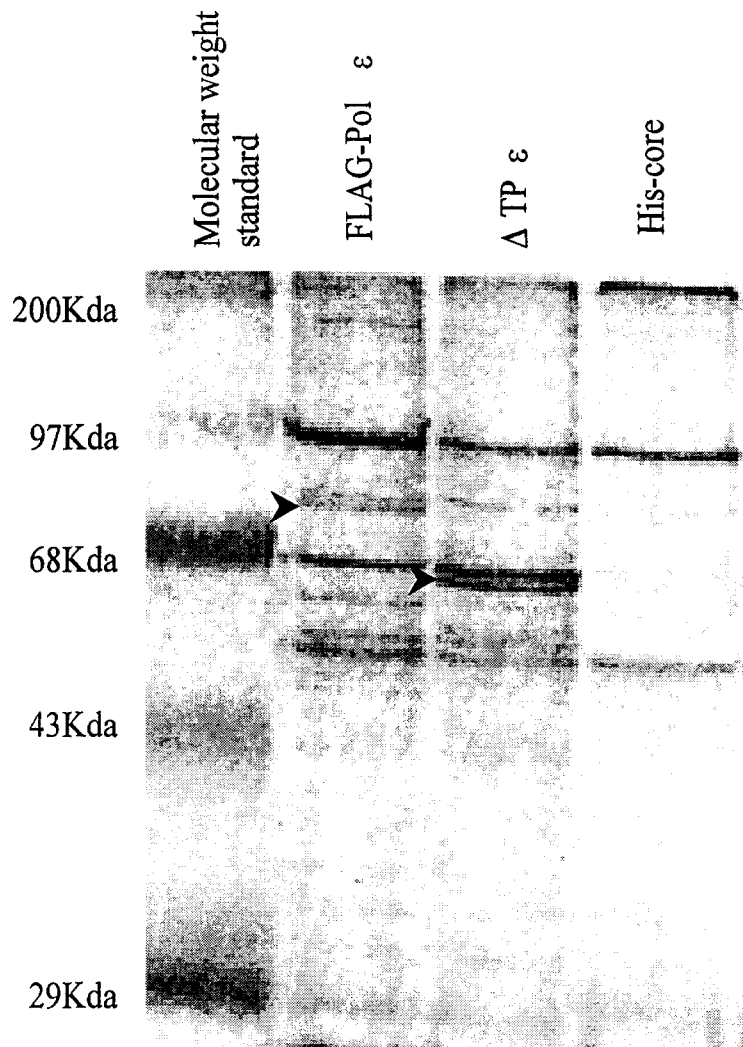
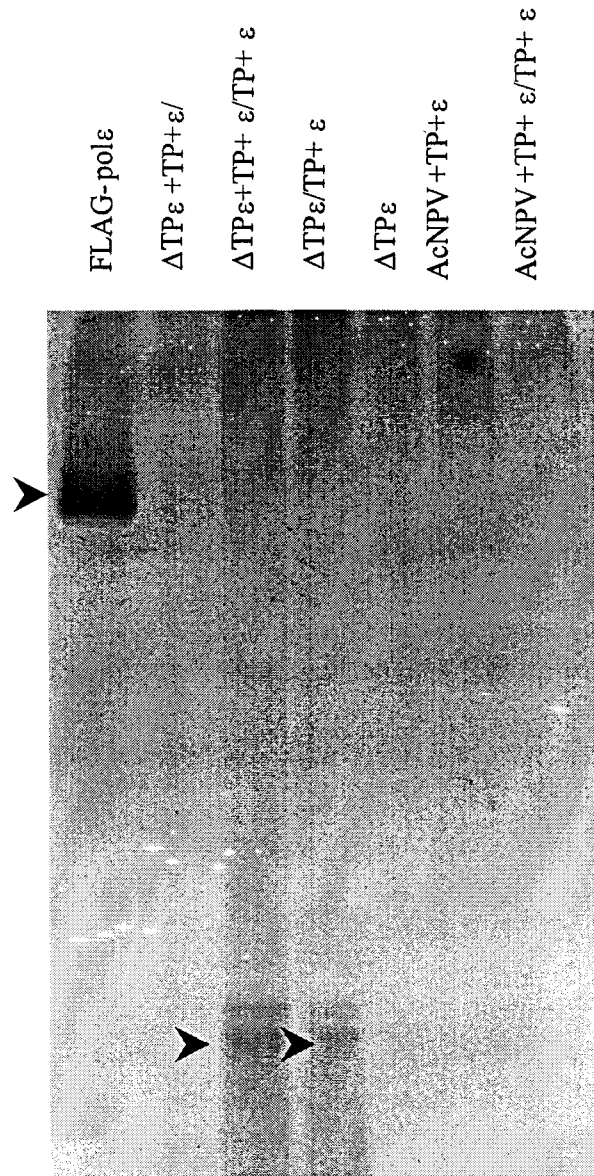


Fig. 2. In vitro association between TP domain and HBV pol mutants. After translation, MBP/POL(CD199) and the mutants is mixed with the binding buffer, purified by amylose resin, analyzed on SDS-PAGE. The detail steps are described in *Materials and Methods*. Arrow indicate the product which was bound to TP domain.



**Fig 3.** FLAG-pol  $\epsilon$ ,  $\Delta$ TP  $\epsilon$  의 발현을 SDS-PAGE에 의한 분석.  
화살표는 각각 FLAG-pol과  $\Delta$ TP protein의 위치를 나타낸다.



**Fig 4.** *E. coli*에서 발현된 TP와 insect cell에서 발현된  $\Delta$ TP와의 transcomplementation assay를 한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. /는 purification 전과 후를 나타낸다. 화살표는 첫 번째 lane은 FLAG-pol이 protein priming에 의하여 labeling된 band를 나타내며, 세 번째, 네 번째 화살표는 transcomplementation에 의한 *E. coli* TP가 protein priming activity를 보여 labeling된 band를 나타낸다.

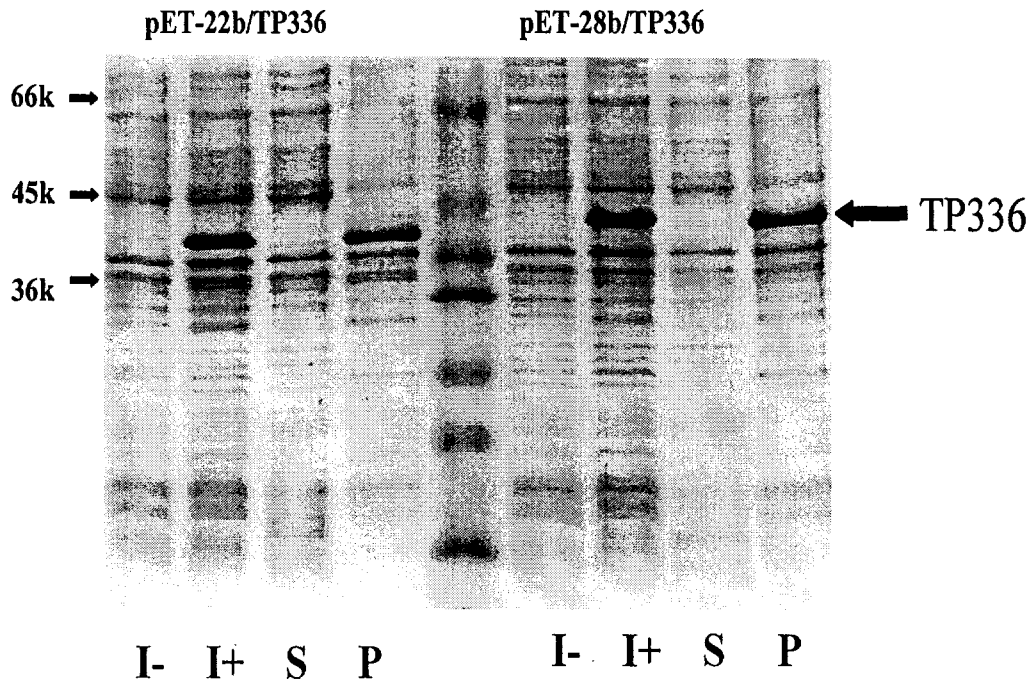


Figure 5. 다른 vector를 사용하여 E.coli(BL21(DE3))에서 발현한 1-336 번 TP domain( I-와 I+ 는 induction 전후를 S와 P는 cell extraction의 상층부와 침전부를 나타냄)

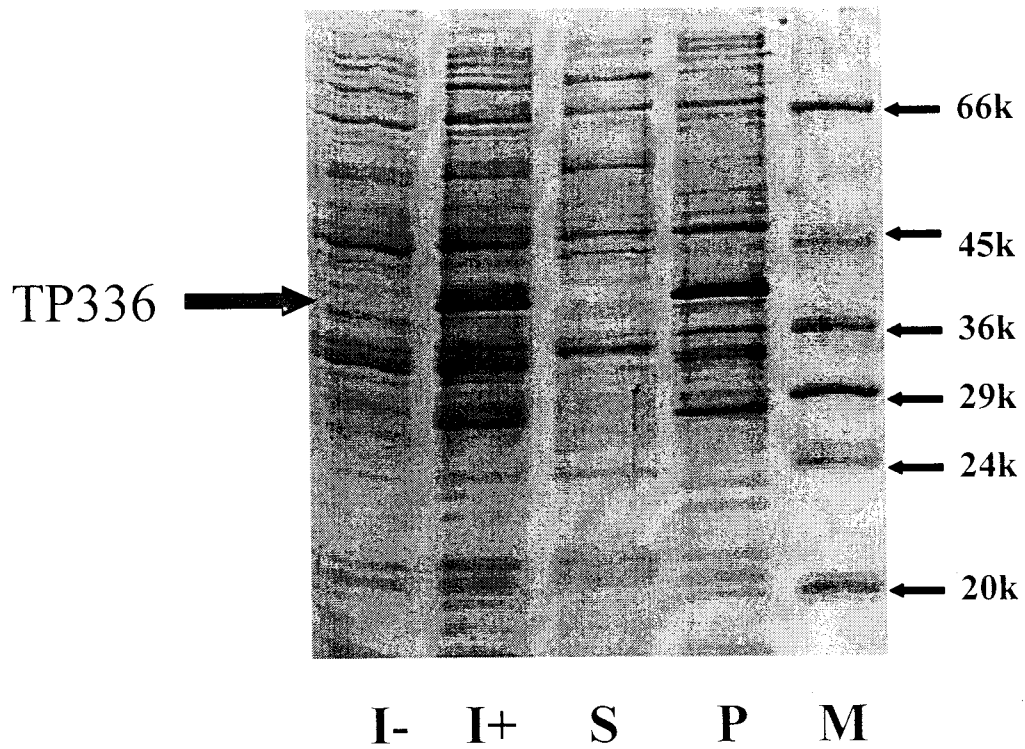


Figure 6. 다른 발현 E.coli cell인 AD494(DE3)를 사용하여서 pET-22b/TP336 domain를 발현

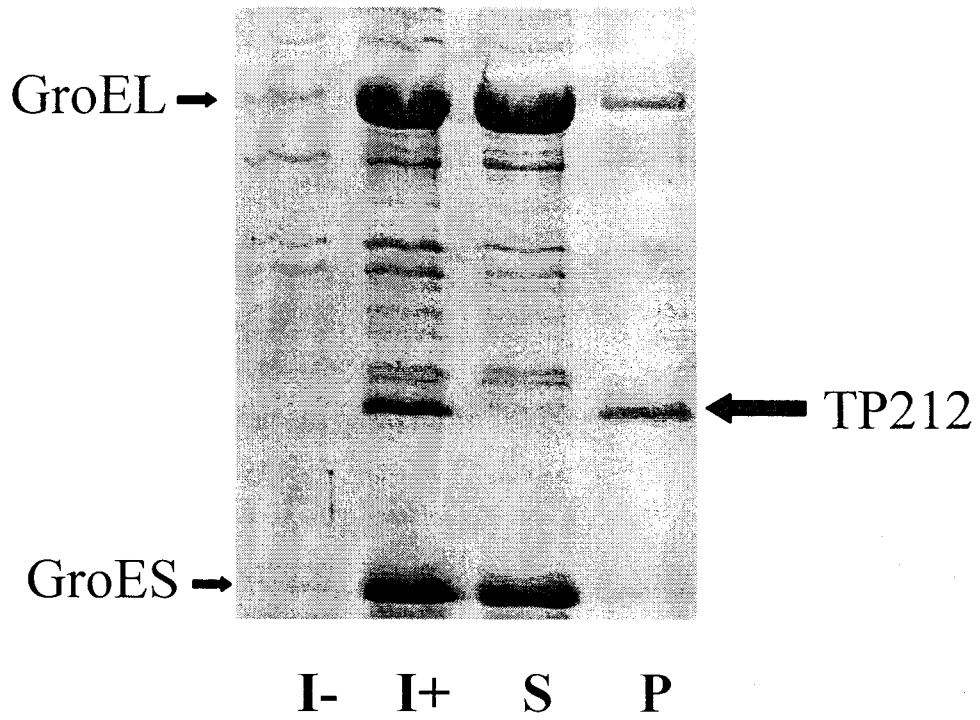


Figure 7. Molecular chaperon과의 co-expression  
(pET-22b/TP212와 pT-GroE)

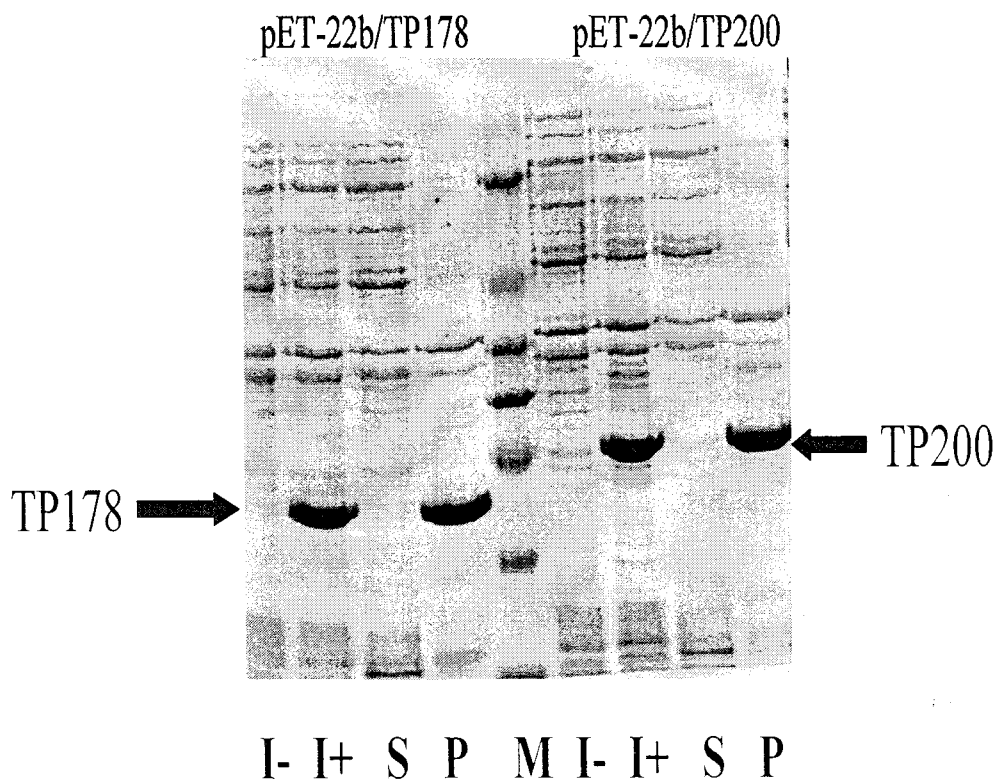


Figure 8. TP178과 TP200의 발현 비교  
 (동일한 pET-22b vector와 BL21(DE3))

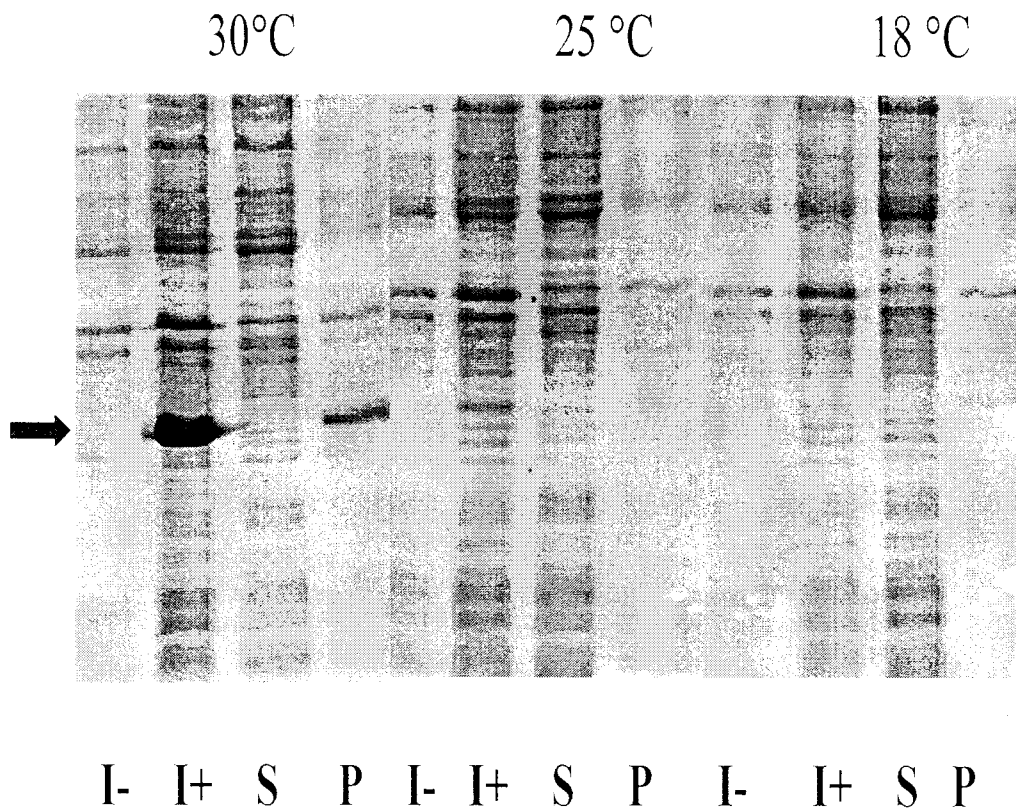
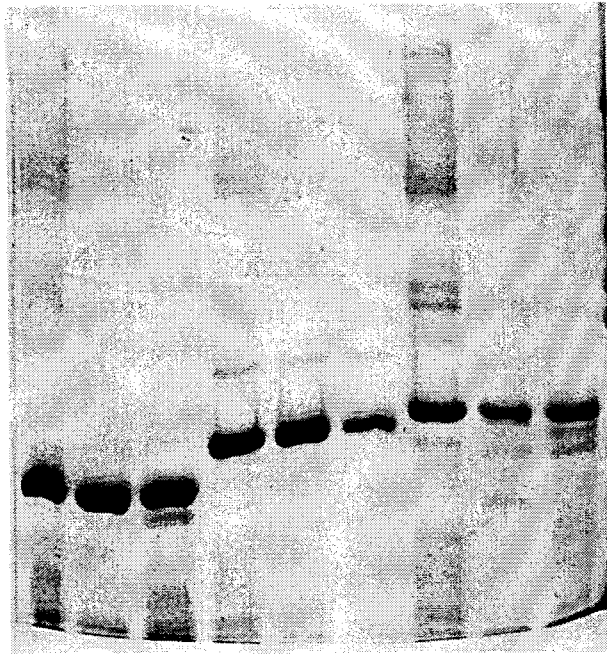


Figure 9. pET-28b/TP212 domain의 induction 온도에 따른 발현 실험  
(host cell은 BL21(DE3))



TP178      TP193      TP212



① Inclusion body

② Ni<sup>2+</sup> Column

③ Superdex-75

① ② ③    ① ② ③    ① ② ③

Figure 10. 각각 다른 TP domain(TP178, TP193, TP212)들의 inclusion body의 분리

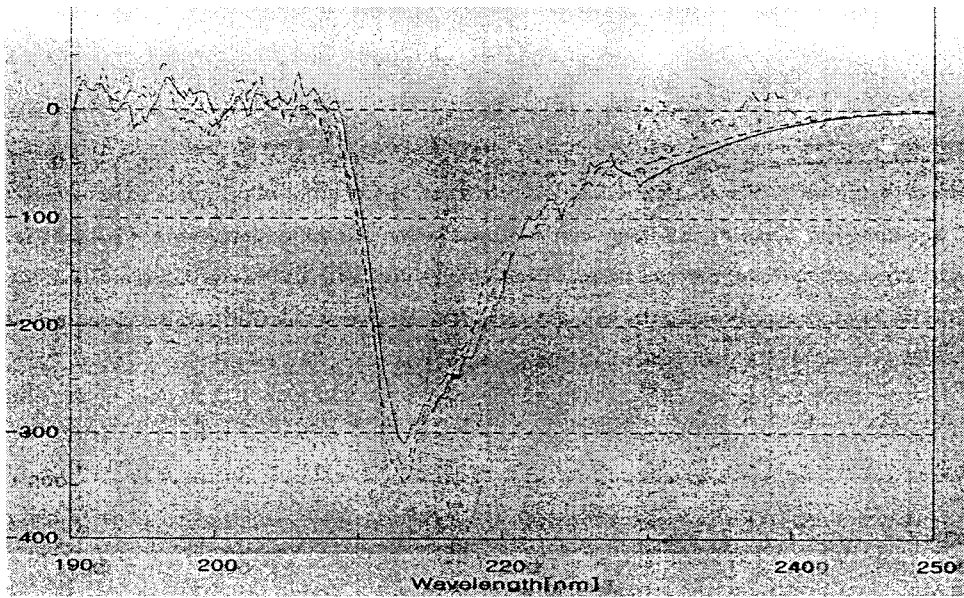


Figure 11. CD spectrum of refolded, soluble TP domain protein

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 4.1 계획비 달성도

번호	연구개발목표	달성내용	달성도 (%)
1	- B형 간염바이러스 terminal protein의 대량 발현 시스템 개발	E. coli에서 human Hepatitis B Virus(HBV)의 GST fused terminal protein의 발현과 woodchuck hepatitis B virus(WHBV)의 6×His fused terminal protein의 발현	90
2	- B형 간염바이러스 terminal protein의 정제 시스템 개발	Ni-NTA affinity, ion exchange, gel filtration에 의한 terminal protein의 정제 시스템 확립	90
3	- B형 간염바이러스 terminal protein의 발현 시스템 개선 (진핵세포 사용)	Insect cell에서 HBV polymerase와 TP의 발현	80

### 4.2 대외기여의 사례

- Insect cell에서 HBV polymerase와 TP의 발현

FLAG-pol $\epsilon$  vector와 TP $\epsilon$  transfer vector는 Bac-to-Bac system을 이용하여 Insect cell에서 HBV polymerase와 TP를 발현하여 inhibitor screening을 가능하게 하였다.

- In vitro priming assay

FLAG-pol을 이용한 In vitro priming assay를 성공적으로 수행하였다.

- HBV polymerase의 fidelity 확인

위에서 서술한 FLAG-pol을 이용한 In vitro polymerase activity assay를 성공적으로 수행하였으며 또한, FLAG-pol이 3'→5' exonuclease activity가 없다는 결과를

얻었다. 이것을 바탕으로 이미 알려진 Human Immunodeficiency Virus(HIV)-1 reverse transcriptase(RT)와 fidelity를 비교하여 HIV RT보다 높은 fidelity를 가짐을 알아냈다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- FLAG-pol을 이용한 In vitro priming assay를 앞으로 priming inhibitor screening system을 확립하는데 활용하려고 한다. 이 priming inhibitor screening system을 이용하여 chemical inhibitor를 탐색하고 탐색된 chemical inhibitor를 이용하여 drug을 design하려고 한다.
- human immunodeficiency virus(HIV)의 reverse transcriptase(RT)의 fidelity보다 높음을 확인하였으며 이를 통하여 mutant를 제조하여 이들의 fidelity를 확인하고, 최근에 RT activity를 inhibit하는 nucleotide analog를 사용하여 이들이 fidelity에 어떠한 영향을 미치는지를 조사함으로써 이들을 이용하는 drug개발에 도움을 주려고 한다.
- 대장균 발현 시스템으로는 HBV의 terminal protein domain을 soluble한 형태로 발현하는데 한계가 있으므로, cell-free expression system, insect cell 또는 drosophila cell expression system등 더 다양한 발현 시스템을 추가적으로 사용하여 발현 여부를 조사해볼 필요성이 있다.

## 제 6 장 참고문헌

Caldentey, J., Blanco, L., Bamford, D.H. and Salas, M. (1993) *Nucleic Acid Res.* 21:3725-3720

Chisari, F. V., Ferrari, C., and Mondelli, M. U. (1989), Hepatitis B virus structure and biology, *Microbial Pathogenesis* 6: 311-325.

Esteban, J.A., Blanco, L., Villar, L. and Salas, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2921-2926

Howard, C. R. (1986), The Biology of Hepadnavirus, *J. gen. Virol.* 67: 1215-1235.

Jeffrey S., Smith, and Monica J. Roth (1992) *J. Virol.* 67, 4037-4040

Lee, H. J., Kwon, Y. T., Rho, H. M., Jung, G. H. (1993) *Biotechnology Letters* 16, 821-826

Jeong, J. H. et al. (1994) *Kor. J. Microbiol.* 32, 565-570

Jeong J-H , Kwak D-S, Rho H. M. and Jung G. (1996) *Biochem. Biophys. Res Comm* 223 264-271

Lanford, R. and Nassal, M., eds. (1996), *Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory

Lee, H. J., Kwon, Y. T., Rho, H. M. and Jung, G. H. (1993) *Biotechnology Letters* 16, 821-826

Lee, Y.I., Hong, Y.B., Kim, Y., Rho, H.M. and Jung G. (1997) *Biochem. Biophys. Res Comm* 233 401-407

Mason, W. S. and Seeger, C., Eds. (1991), *Hepadnaviruses: Molecular Biology and Pathogenesis*, Springer-Verlag

Pronk, R. and Van der Vliet, P.C. (1993) *Nucleic Acid Res.* 21:2293:2300

Robinson, W. S. (1994), Molecular Events in the Pathogenesis of Hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma, *Annu. Rev. Med.* 45: 297-323.