

바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석

Search for Cellular Genes Related to Liver Cancer Caused
by Hepatitis B and C Viruses and Their Functional Analyses

한 국 생 명 공 학 연 구 원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “위암/간암 관련 유전체 기능에 관한 연구”과제 (세부과제 “바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석에 관한 연구”) 의 보고서로 제출합니다.

2003. 7.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 임 동 수

세부연구책임자 : 이 영 익

” : 김 연 수

” : 허 광 래

협동연구기관명 : 연세대학교

협동연구책임자 : 한 광 협

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2001. 01. 01. - 2003. 06. 30	단계 구분	(1단계) / (3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	위암/간암 관련 유전체 기능에 관한 연구			
	세부과제명	바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석			
연구책임자	임 동 수	해당단계 참여연구원수	총 : 73명 내부: 27명 외부: 46명	해당단계 연구비	정부 : 1,070,000 천원 기업 : 0 천원 계 : 1,070,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)한국생명공학연구원, 세포생물학연구실 (협동)연세대학교 의과대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	209
<p>C형 및 B형 간염 바이러스 (HCV, HBV)는 간암을 일으키는 주인자로서 알려져 있음. 본연구에서는 간염바이러스에 의한 간암의 발생과정에 관여하는 세포인자를 발굴하고 그 기능을 규명하여 간암의 예방 및 치료기술개발에 기여하고자 하였음.</p> <p>HCV에 의한 간암발생에서 NS5A, Core의 역할을 알아보하고자 이들 단백질에 의해 조절되는 수종의 세포인자를 발굴하고 그 기능을 규명한 결과 HCV 감염시에 host shut off 기작을 발견하였음. 발굴된 유전자들 일부가 세포 주기조절 및 암화에 관련한다는 보고에 미루어 HCV 감염시에 Core 단백질은 세포의 주기를 조절하여 apoptosis를 피하고, 간암을 유발하는데 관여할 것으로 사료되었음. PRMT5는 Jak kinase와 함께 인터페론 신호전달계에 작용하여 상승효과를 나타내는 인자로 나타났으며, NS3는 PRMT5와 서로 결합하므로서, 이러한 작용을 억제할 것으로 추정되었음. 효모 two-hybrid를 통하여 HCV의 NS5A와 결합하는 세포인자들로서 hTcd37, AHNAK-related protein, SFRP4, NDRG1, MGP, PP2A regulatory subunit 외에 12종을 발굴하였고. 이들간의 결합을 in vitro, in vivo에서 검증하였음.</p> <p>HBx 유전자발현에 의한 인체 간세포주의 사멸유도방법 및 기전을 규명하였으며, HBx 유전자발현에 의해 발현양상이 변화되는 66 종류의 유전자 발굴하였고, HBx 유전자를 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자 탐색 시스템을 개발. HBx의 function에 관련된 신규 유전자를 발굴, 분리하기 위하여 yeast two-hybrid analysis, DD-PCR analysis, promoter binding assays 등의 방법을 이용하였고, 그 결과 HBx에 의해 영향을 받는 여러 유전자들을 분리하는데 성공하였음. HBx 관련 신규 유전자들을 transcriptional acetylation에 관련된 유전자, mitochondrial physiology와 관련된 유전자, 그리고 HBx promoter에 결합하는 유전자 등 크게 세 그룹으로 구분하고, 각각 HBx 단백질과 관련하여 기능연구를 수행. HLA Class II DR 13 표현형중 한국인에서 관련 주요 유전형확인과 관련 면역유전적 요인 관여 후보유전자로 TNF-alpha promoter polymorphism을 검색. B형 간염 바이러스 감염 환자에서 간염의 진행으로 인한 간암 발생 관련 면역유전자 탐색으로 Mannose Binding Lectin gene의 돌연변이와 B형 간염 바이러스에 의한 간 질환과의 관계를 규명. 가계도에 의한 간암과 HBV 감염 연관성 조사 및 sample의 임상정보 DB를 구축.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	간암, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, HBx 단백질, 코아, NS5A, NS3단백질			
	영어	Liver cancer, HBV, HCV, HBx protein, HCV core, NS5A, NS3 proteins			

요 약 문

I. 제 목

바이러스성 간암관련 신규 유전자발굴 및 기능 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

C형 및 B형 간염 바이러스 (HCV, HBV)는 간암을 일으키는 주된 원인인자로서 알려져 있다. HCV는 주로 수혈에 의해 전염되고, 만성 간염을 일으키며 장기간의 간에서의 잠복기를 거쳐 간경화, 간암의 원인이 되는 인자로 공인되어 있다. 국내 HCV 감염율은 약 1%정도이고, 감염자의 60-80%가 만성간염으로 진행되고, 이 중 20%정도에서 간암이 발생한다. 전세계적으로 anti-HCV 양성인 사람이 1억7천만명으로 보고되고 있다. HCV 감염에 의한 간암 환자의 발생은 증가하고 있고, 증가할 것으로 보인다. 따라서 HCV에 의한 간암발생에 직간접적으로 관여하는 세포 인자의 발굴 및 기능 규명연구는 간암예방 및 치료기술 개발에 초석이 될 수 있다.

HCV는 단일가닥의 (+)RNA 바이러스로서 약 10 kb의 유전체 크기를 갖으며 10종의 단백질들 정보를 갖고 있는 데, HCV의 putative oncogene (core, NS3, NS5A)들과 결합하는 세포인자들이 규명되고 있으나 이들과의 상호작용에 의해서 영향을 받는 세포 유전자들이 유전체 수준에서 규명되지 않고 있다. 이러한 바이러스 유전자 산물과 세포신호 전달인자나 세포 전사조절인자간의 상호작용에 의해 upregulation 혹은 downregulation되는 세포 유전자들을 유전체 수준에서 발굴하여 그 기능을 규명하는 것은 HCV에 의한 간암의 예방 및 치료기술개발에 활용될 수 있다. 본 과제에서는 Core, NS5A에 의해 그 발현이 변화되는 세포인자들을 발굴하고 간암 발생과의 연계성을 규명하여 간암발생의 원인을 분자세포수준에서 규명하고자 하였으며, NS3와 세포인자 (PRMT5)간의 상호결합의 생물학적 기능과 그 의미를 이해하고자 하였다. 또한 NS5A에 직접적으로 결합하는 인자들을 효모의 two-hybrid 체계를 이용하여 발굴하고 간암 발생측면에서 그 기능을 분석하고자 하였다.

B형 바이러스성 간염 및 간암은 한국인에게 가장 많이 발생하는 질환이지만 아직 그 기전이나 예방, 그리고 효율적인 치료방법이 없는 실정이다. 그러므로 계놈 수준의 기능 유전체학 기술을 이용한 간암 관련 신규 유전자의 발굴은 매우 시급하며 중요한 사안이다. 따라서 본 과제에서는 레트로바이러스 cDNA 발현 라이브러리 시스템 및 cDNA array 기술을 이용하여 HBx 단백질에

의한 인체 간세포의 세포사멸에 관련된 세포유전자를 발굴 및 규명을 목표로 수행되었다.

HBV-X 단백질(HBx)이 간암 발생의 직접적인 원인으로 밝혀진 이후 HBx가 여러 유전자들을 활성화시킴으로써 암을 일으킨다는 연구가 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고, 아직도 B형 간염바이러스에 의한 발암 기전은 명확하지 않은 상태이다. 이에 B형 간염 바이러스의 주요 산물인 HBx 단백질에 관련된 신규 유전자를 발굴, 분리하여 이들의 기능 분석을 통해 간암의 발병기전을 이해하고자 하였다.

HBV의 감염후 만성간염에서 간암으로까지의 다양한 임상 경과에 영향을 줄 수 있는 숙주요인 중 바이러스 감염에 대한 저항성과 감수성에 핵심적 역할을 하는 면역유전학적 요인 (immunogenetic factor)을 규명하고자하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. HCV NS5A 및 Core유전자에 의해 조절되는 간세포 유전자 발굴 및 기능 분석

- NS5A 발현 세포주 제작, 특성규명, 세포주를 이용한 유전자 발굴 및 기능 분석
- Ad.NS5A, Ad.core 바이러스 제작 및 발현검증
- Ad.NS5A, Ad.core 바이러스의 사람 간세포주로의 transduction 조건확립
- Ad.NS5A, Ad.core 바이러스의 생쥐 정맥내 주사, 간조직 적출, mRNA 분리, labeled-cDNA library 구축
- PCR-based cDNA subtraction (forward, reverse)을 이용한 NS5A al Core에 의해 조절 받는 유전자 발굴
- cDNA microarray를 이용한 NS5A에 의해 조절받는 유전자 발굴
- 2D SDS-PAGE이용 변화되는 프로테옴 분석을 통한 NS5A 및 Core에 의해 조절받는 단백질/유전자 발굴
- RT-PCR 및 Northern blot을 통한 발굴된 유전자의 유의성 검증
- 발굴된 유전자의 전장 cDNA 구축
- 발굴된 유전자의 기능분석을 통한 HCV에 의한 간암 발생과의 연계성 규명

2. 발굴된 유전자의 세포내 기능 분석

- 프로모터 분석을 통한 cis/trans element의 탐색
- cis element mutant 제작을 통한 검증
- 발견된 transcription factor를 통해 관련된 signal pathway 탐색
- HCV replicon system에서의 발현 조절 확인
- NS5A 발현 세포주의 특성을 기초로한 NS5A의 세포내 기능 규명

3. NS3의 세포조절기능 분석

- NS3단백질의 posttranslational modification조사
- NS3-PRMT5 및 Jak kinase-PRMT5간의 상호결합능 조사
- NS3-Jak kinase-PRMT5간의 상호연결성 조사
- NS3-Jak kinase-PRMT5 상호작용의 생물학적 의미 규명
- NS3와 PRMT5간의 상호작용과 HCV에 의한 간암과의 연계성 조사

4. Yeast two hybrid 방법을 이용한 세포내 NS5A와 상호작용인자 분석

- pHybLex/Zeo-NS5A bait가 효모 숙주에 미치는 영향 검증
- Yeast two-hybrid에 bait로 사용될 pHybLex/Zeo-NS5A 와 파생 유도체 플라스미드의 제조
- Yeast two-hybrid 스크리닝 실험
- Elimination of false positive and Sequencing of library plasmids
- Northern blot이나 RT-PCR로 유전자의 발현 유무를 확인 검증
- In vitro binding 실험
- 발굴 단백질의 기능 분석 실험

5. B형 간염 바이러스에 의해 조절되는 세포내 유전자의 발굴 및 기능 분석

1) Retroviral cDNA expression library system 확립, Retroviral cDNA expression library system 확립, HBV X 단백질에 의한 세포사멸을 protection 하는 세포단백질 발현 유전자 3종 발굴하였다.

2) HBV의 간암 형성 기작에 관련된 HBx 단백질과 상호작용하는 신규 유전자를 발굴, 분리하기 위하여 yeast two-hybrid analysis, DD-PCR analysis 그리고 promoter binding assays 등의 방법이 이용되었고, 그 결과 HBx에 의해 영향을 받는 여러 유전자들을 분리하는데 성공하였고 이들에 관한 functional study를 진행하였다.

3) TNF- α promoter gene polymorphism과의 관련성 확인을 위한 대단위 연구를 통해 가족내 유전적 요인 규명, HLA-DR type 특정유전자와의 연관성 조사하고 각종 만성 B형 간질환에서 HBV genotype과 간질환 진행 및 간암과의 관련성을 검토하였다. 또한 B형 간염바이러스에 의한 간질환의 정도에 따라 환자의 혈액으로부터 MBL 유전자의 point mutation 조사 및 질환과의 연관성 연구하였고 간암 발생 가족내 B형 간염 감염 후 임상적 다양성과 유전적 요인과의 관련성을 조사하기 위한 가계도 조사 및 혈액 채취로 검체 확보후 TNF- α promoter gene polymorphism을 비롯한 후보유전자 간의 연관 관계에 관한 연구하였다.

IV. 연구개발결과

1. NS5A 및 Core에 의해 조절되는 세포내 유전자의 발굴

(1) DNA-Chip을 이용한 분석

Ad. NS5A를 도입한 생쥐 간을 이용한 DNA chip분석을 실시하였을 때, 1-8U라는 유전자가 Ad.NS5A로 transduction된 세포주에서 repression되어 있는 것을 발견하였다.

(2) 2D-electrophoresis를 이용한 세포내 유전자들의 발굴

HCV NS5A 또는 Core 단백질에 의해 조절되는 세포내 유전자를 단백질 수준에서 탐색하기 위하여 2D-electrophoresis를 실시하였다. 그 결과, NS5A에 의해 발현이 증가된 것으로 나타난 유전자는 NRF (NF κ -B repressing factor), Hsp 90 (Heatshock protein 90)등으로 나타났으며, Core에 의해 발현이 증가되는 유전자는 Cytochrome P 450, Neurofibromatosis, CDC-Kinase 3, Myelin transcription factor, TGS101 (Tumor susceptibility gene 101), KIAA1254, Ras-GRF2 이었으며, RT-PCR 및 Northern blot에서 유의성을 나타낸 것은 TGS101, KIAA1254, Ras-GRF2등 으로 나타났다.

(3) PCR-based cDNA subtractive hybridization 이용한 세포내 유전자들의 발굴

PCR-based subtractive hybridization으로 NS5A에 의해 조절되는 세포내 유전자를 발굴한 결과, up regulation되는 유전자로는 ATP synthase, Enolase, GADPH, Cytochrome oxidase II, Lactate dehydrogenase등이 있었으며, down regulation되는 유전자에는 Thymosin, Beta2 microglobulin, POLR2k, Transmembrane super family 4, Phospholipase A2 등이었다. 위의 유전들은 각각의 유의한 차이를 보였으나, 특히 RNA polymerase II polypeptide K (POLR2k)는 NS5A에 의해 현저히 그 발현이 저해되는 것으로 나타났으며, NS5A에 의한 POLR2k의 조절은 몇 종의 hepatocarcinoma cell line에 Ad.NS5A가 도입되었을 때도 확인되었다.

Core의 경우에는 Cytochrome C oxidase subunit 1, Cabamoyl phophate synthetase 1, Protein phosphatase 1, Signal peptidase spc 22/23, Beta2 Microglobulin, , HLA-B, RP11-292913 등의 유전자들의 up regulation 되어 있는 것으로 나타났으며, MDM2, Annexin A2,,H2A histone family member Z, SET translocation, RP11-77n9 , Rp11- 713019, Rp11-452f10, SMAP42등의 유전자들이 down regulation 되어있는 것으로 나타났다. 그러나 Northern blot의 방법으로는 유전자의 의미 있는 발현 조절을 관찰할 수는 없었다.

2. NS5A에 의해 down regulation 되는 POLR2k의 세포내 기능 분석

(1) POLR2k 발현 조절 기작 규명

프로모터 분석 및 reporter assay를 통하여 IRE가 (AATCAAGAGAAAGG)를 통한 IRF-1이 POLR2k 의 발현조절에 중요한 transcription factor로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

(2) NS5A에 의한 IRF-1의 발현 저해에 따른 POLR2k의 down regulation

NS5A에 의한 POLR2k의 down regulation은 IRF-1의 down regulation에 기인한 것으로 사료되어지며, POLR2k는 IRF-1이 중심적으로 관여하는 interferon (IFN) 신호전달과정에 관여하고있을 것으로 조심스럽게 추측할 수 있었다. 또한 NS5A에 의한 이러한 down regulation은 HCV 감염에 있어 IFN 저항성을 유발할 수 있을것으로 사료되어 졌다.

(3) HCV replicon system에서 PLR2k 발현 양상

HCV replication이 항상일어나고 있는 세포주에서 POLR2k의 발현이 현저히 POLR2k의 발현이 저해되어 있음을 확인 할 수 있었다.

(4) NS5A 발현 세포주의 특성

① 세포성장 속도와 NFkB 활성화 감소

HeLa-NS5A 세포주의 성장속도를 HeLa-Neo 세포주와 비교한 결과 2종 모두에서 세포의 성장률이 감소되어 있음을 발견하였다. HeLa-NS5A 세포주에서 NFkB활성이 감소되어 있음을 발견하였다.

② Wild type 아데노 바이러스 (WT.Ad)의 복제 저해

HeLa-NS5A 세포주에서는 WT.Ad에 의한 CPE가 현저히 감소하였음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 HeLa-NS5A의 세포주에서 viral genomic titer의 감소, VA 및 E1A 유전자 발현의 감소등으로 확인되었다. 또한 HeLa-NS5A 세포주에서 WT.Ad의 infectious viral particle형성이 현저히 낮게 나타났다.

③ RNA polymerase II 활성화 감소

HeLa-NS5A 세포주의 RNA polymerase II 활성화가 HeLa-Neo dp 비하여 약간 감소 되어있었다. 이러한 현상은 NS5A가 HCV 감염시에 바이러스에 의한 host shut off 기작에 관여 할 것으로 사료되어졌다.

3. HCV NS3단백질의 세포조절 기능규명

RNA 결합단백질은 arginine-glycine (RG)repeat를 갖고 있고, 이 RG repeat가 methylation되는 것으로 알려져 있어 PRMT5와 NS3 단백질과의 결합은 RNA 결합 단백질의 일종인 NS3단백질이 methylation될 수 있다는 가능성을 제시하였고, 이를 조사한 결과 NS3단백질은 세포 내에서 methylation되어 있으며, 시험관내에서 PRMT1에 의해 methylation되며, methylation되는 NS3단백질 영역은 pNS3 protease 영역이 아니라, helicase domain이라는 것을 밝혔다. NS3 helicase영역에 존재하는 어떤 arginine residue가 methylation되는 지를 조사한 결과 NS3 helicase domain IV의 1493번에 위치한 arginine이 주로 methylation되며, arginine-1488도 methylation될 수 있음을 밝혔고, NS3 helicase의 domain IV의 arginine-1493이 RNA binding에 직간접적으로 관여하고 있다는 것을 밝혔다. NS3단백질과 PRMT5가 세포내에서 서로 결합

하는 것을 coimmunoprecipitation 및 colocalization 실험을 통하여 알 수 있었고, 이 NS3-PRMT5 상호작용의 생물학적 의미를 조사한 결과 PRMT5가 IL-6 혹은 인터페론 감마의 신호전달에 positive factor로 작용한다는 것과, PRMT5의 methyltransferase 활성이 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달 과정에 관여되어 있고, NS3 단백질이 인터페론 신호전달에서 negative factor로 작용할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

4. Yeast two hybrid 방법을 이용한 세포내 NS5A와 상호작용인자 분석

NS5A full-length와 4 종류의 NS5A 유도체, 즉 NS5A-a (NS5A1~150aa), NS5A-b (NS5A1~300aa), NS5A-c (NS5A300~447aa) 그리고 NS5A-d (NS5A150~447aa)를 bait로 이용하여 yeast two-hybrid screening을 수행하였다. 그 결과, HCV의 NS5A full-length와 상호 결합하는 3 종류의 단백질, 즉 hTcD37 (gi: 24308263), AHNAK-related protein (gi: 535177) 그리고, Secreted Frizzled-Related Protein 4 (SFRP4, gi: 8400733)을 발굴하였다. NS5A-b와 상호 결합하는 N-myc Downstream Regulated Gene 1 protein (NDRG1, gi: 13112003) Matrix Gla Protein (MGP, gi: 187591), 그리고 Serine/ threonine Protein Phosphatase 2A, regulatory subunit (PP2A, gi: 190422)를 발굴하였다. NS5A-c와 상호 결합하는 단백질로 12 종류를 발굴하였다. ; Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1 (CRABP-I, gi: 4758052), Ferritin Heavy Chain (FTH1, gi: 120516), Translok인 (gi: 12654781), SVAP1 protein (gi: 20135645), phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K, gi: 2326227), Human U1 Small Ribonucleoprotein 70 kDa Protein (SRNP, gi: 337446), Prothymosin alpha (gi: 18490877), Pro Alpha 1(I) Collagen (COL1A 1, gi: 4755085)와 Centaurin Delta 2 (CENTD2, Rho-GAP, gi: 21264597) 그리고 3 종류의 unknown protein, 즉 CTD-253719 (gi: 21743742), 및 MGC 2574 (gi: 12655057), Human Chromosome 9 Open Reading Frame 6 (gi: 12002684)을 발굴하였다. 또한 *in vitro* binding assay를 통하여, 발굴된 단백질들이 NS5A full-length와도 상호 결합하는 것으로 확인하였다.

HCV의 NS5A와 상호 결합하는 숙주세포 단백질을 살펴볼 때 상당수가 숙주세포 내에서 Ras 신호전달 체계와 관련이 있으며, 이러한 결과로 보아 HCV의 NS5A가 Ras 신호전달 체계를 교란함으로써 간질환을 유도할 수 있으리라 추정된다. 이런 사실은 HCV의 NS5A가 훌륭한 HCV 관련질환의 분자표적이 될 수 있다는 점을 시사한다.

5. B형 간염 바이러스에 의해 조절 받는 유전자의 발굴 및 기능 분석

1) HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 세포사멸을 유도시키는 방법 및 이 방법을 이용하여 세포사멸 억제 물질 및 유전자를 탐색하는 방법 개발하였으며, HBV X 단백질에 의한 세포사멸을 protection 하는 세포단백질 발현 유전자 3종 발굴하였다.

2) yeast two-hybrid analysis를 통하여 HBx와 결합하는 신규 유전자를 동정하였고 그 결과

HDAC1이 HBx와 상호작용 하는 것으로 확인되었다. 또한 세포주기 신호전달에 영향을 주리라 사료되는 HBx의 복제 증가 프로모터를 발견하였으며 이에 결합하는 8개의 신규 단백질을 발굴하였다. apoptosis에 관련 유전자들을 DD-PCR을 통하여 확인한 결과 HBx는 전자전달계 관련 mitochondrial enzyme들을 downregulation하는 것으로 확인되었고, HBx의 발현이 직접적으로 apoptotic signaling을 activation 하는 것은 아님을 밝혀내었다.

3) B형 바이러스성 간염은 감염 후 다양한 임상경과를 보이며 이는 HBV 감염에 대한 감수성의 차이에 숙주인자가 결정적으로 관여하며 특히 TNF- α -308 promoter polymorphism이 HBV의 제거와 관련이 있었다는 것을 알아내었다. 또한 최근에 B형 간염과 chemokine system polymorphism 중 CCR5의 59029 부위 G/G homozygote이 바이러스를 극복하는데 효과적인 인자라는 새로운 사실을 예비실험을 통하여 밝혀서 현재 보완 연구를 진행 중이다.

V. 연구개발결과의 활용계획

HCV로 감염된 환자의 60-80%가 만성 간염으로 진행되고 만성 간염환자중에 20%가 간경변증을 동반하는 간세포암으로 진행된다. 이러한 HCV에 의한 간세포암화과정을 분자세포수준에서 이해하기 위하여 본 연구는 수행되었다. 본 연구에서 HCV NS5A에 의해 조절받는 수종의 세포유전자를 아데노바이러스 유전자 전달체 및 NS5A발현 세포주를 이용하여 발굴하고 이들이 어떻게 NS5A에 조절되는 지를 조사하여 새로운 HCV에 의한 host cell metabolism shut-off 기전을 제시하였다. 세포의 증식을 촉진하거나, 세포주기의 이상을 유도하는 수종의 세포인자들이 HCV core에 의해 induction될 수 있음을 밝혔고, Core에 의해 이러한 유전자들의 발현이 증가되는 현상은 HCV의 core에 의한 간세포암화 과정을 분자세포수준에서 규명하는 데에 유용한 소재로서 활용될 수 있을 것으로 보인다. HCV NS3 단백질이 PRMT5와 물리적으로 결합하고 있고, PRMT5 methyltransferase활성이 인터페론 신호전달에 positive factor로 작용하고 있음을 본 연구팀이 밝혔고 PRMT5와 Jak kinase와의 상호결합은 NS3에 의해 저해받으며, 이러한 PRMT5-Jak kinase 상호작용이 NS3으로 인하여 장애를 받아 HCV NS3단백질이 인터페론-Jak-Stat 신호전달에 영향을 줄 것으로 추정되었다. 이 현상은 HCV가 만성간염을 유발하는 이유가 될 수 있으며, 이는 궁극적으로 간암 발생과 연관되어 있을 수 있다. 이러한 새로운 연구소재 및 본 연구결과에서 얻어진 새로운 연구가설은 HCV에 의한 간암을 예방하거나 치료하는 기술의 개발에 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

Yeast two hybrid 방법으로 HCV의 NS5A와 상호결합하는 것으로 밝혀진 숙주세포 단백질군의 상당수가 Ras 신호전달계를 교란하는 작용을 통하여 숙주세포의 면역체계를 탈피하고, 간암의 발병 원인을 제공할 것으로 사료된다. 향후 이런 방향의 추가 기능연구를 통하여 간암의 발병원인을 규명하고 간암 예

방의 선도 분자표적을 발굴하는데 사용하고자 한다.

발굴된 HBx-mediated apoptosis 관련 유전자들의 세포 내 발현을 동력학적으로 분석하여 생명현상을 시스템 관점에서 분석하고 이를 근거로 질병 발생 상황을 simulation 할 수 있는 시스템 개발에 활용 예정이다. HBx가 HDAC1의 recruiting을 통해 목표유전자의 발현을 조절한다는 사실은 본 연구진에 의해 최초로 밝혀진 것으로서 HBx의 간암생성 기작을 이해하는 앞으로의 연구에 중요한 기초를 제공할 것으로 기대된다.

S U M M A R Y

Hepatitis C virus (HCV, the family of Flaviviridae) is well known to be associated with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Its genome [(+) single-stranded RNA] consists of 9.6 kb, which produces 10 polyprotein including core, NS5A, and NS3. We found that the NS5A of HCV modulates the expression of cellular genes POLR2K, 1-8U, thymosin beta 4, NRF and HSP90 genes. Since POLR2K, which is a smallest subunit of host RNA polymerases, was severely repressed by the NS5A, we focused on how and why NS5A represses POLR2K gene among other genes. Unexpectedly, we found that putative IRF-1 binding site is present in the promoter region of POLR2K. We obtained preliminary evidences that NS5A repressed POLR2K gene expression through the putative IRF-1 binding site and IFN induced expression of POLR2K. This is an accumulating evidence that the NS5A is responsible for IFN resistance through interference of the NS5A with DNA binding activity of IRF-1 or down-regulation of IRF-1. Our preliminary data suggest that the expression of IRF-1 gene itself is also down-regulated by the NS5A. This is a significant result which can partially account for oncogenesis of HCV, because in addition to being involved in the regulation of the IFN system, IRF-1 is also involved in oncogenesis as a tumor suppressor. Although we have yet to determine whether POLR2K protein level and host RNA polymerases activities are indeed decreased in a variety of cells expressing NS5A, we found that adenoviral propagation in HeLa-NS5A cells is significantly impaired compared to parental cells. We hypothesized that a biological consequence of the repression of POLR2K by NS5A may be a host shut off mechanism of HCV. Since it is largely unknown how HCV shuts off host metabolism, this is other significance of our results. Finally, since POLR2K is an essential subunit of host RNA polymerases, it will be interesting and important to know why POLR2K expression is regulated by IRF-1 which is induced by many cytokines. Further study on that aspect may contribute to understanding molecular mechanisms by which host RNA polymerases are regulated. The core of HCV induced expression of TSG101, KIAA1254, and Ras-GRF2 genes. TSG101 gene was originally discovered for potential tumor suppressor using insertional mutagenesis in immortalized fibroblasts. Altered transcripts of this gene have been detected in sporadic breast cancers and many other human malignancies. Recent results indicate that TSG101 is essential for cell growth, survival, and proliferation, but not a primary tumor suppressor in mouse embryonic fibroblasts. KIAA1254 (CPR8) is one of

human cell cycle progression restoration (CPR) genes. This gene was discovered in search of human genes that allow yeast cells to progress through the cell cycle in the presence of an activated pheromone response pathway. Since then, no study on this gene has been performed and the function of KIAA1254 is unknown. It is speculated that KIAA1254 gene may regulate cell growth positively. Ras-GRF2 (guanine nucleotide releasing factor 2) is a widely expressed, calcium-activated regulator of the small-type GTPases Ras and Rac. Epithelial cells overexpressing Ras-GRF2 are morphologically transformed and grow in a disorganized manner with minimal intracellular contacts. The known or assumed functions of the three genes suggest that they regulate cell growth positively. Although we have yet to determine whether expressions of those genes are indeed increased by the core at protein level, those are candidate genes that may function as important mediators in the core-mediated transformation. We found that NS3 protein physically associates with PRMT5, and the NS3 protein is an *in vitro* substrate for PRMT1. We obtained experimental evidences suggesting that NS3 is responsible for IFN resistance, while the PRMT5 enzyme activity enhances IFN response. These are significant and important results which can explain why NS3 interacts with PRMT5 that interacts with Jak kinases. Since IFN resistance of HCV patients can not be explained throughly by the interaction of NS5A with PKR, the negative regulation of IFN response by the NS3 is likely one of several mechanisms which HCV employs to counteract IFN response and appears to be physiologically relevant.

We have performed a yeast two-hybrid experiment with the human liver cDNA prey-library using the NS5A protein of HCV as a bait. For experimental convenience, we have divided NS5A into 4 different domains NS5A-a(1~150 aa), -b(1~300 aa), -c(300~447 aa), and d(150~447 aa) in addition to NS5A-F (full-length, 1~447 aa). Yeast two-hybrid with NS5A-d was not suitable as all the transformants showed blue color due to its nature of a transcriptional activation domain. Also, yeast two-hybrid with NS5A-a did not give any candidate transformants. Yeast two-hybrid with NS5A-F gave 3 candidates, SFRP4, AHNAK-related protein, *hTcd37* (homologue of GTPase activating protein). Through *in vitro* binding assay, *hTcd37* was confirmed to interact with NS5A. The results with NS5A-b gave 3 clones (NDRG1, MGP, and PP2A) In addition, yeast two-hybrid with NS5A-c gave 12 candidate clones. Through *in vitro* binding assay, 5 clones were identified to interacting with NS5A.

In overall, 3 candidate clones are related with Ras signaling, which means the role of

NS5A may be activating the host RASSF1 signaling pathway to drive host cells to provide HCV with organic molecules for their successful replication. Among 3 of them, *hTcd37* is highly homologous to the *Drosophila* Prune protein, a homologue of mammalian GAP. Also, C78 (CENTD2) and C45 clones (PI4K), may be related with Ras signaling as they have typical domains for Rho-GAP and PI3K, respectively.

Successful identification of the cellular factors that regulate the X protein of HBV strongly depends on the experimental system. The viral X protein plays a key role for cell transformation and apoptosis. Here, we demonstrate for the first time that oxidative stress results in death of liver cells expressing the HBx protein. Based on these results, we established a method for identification of the cellular factor(s) that inhibits the X protein-dependent apoptosis. To determine the role(s) of ROS (Reactive Oxygen Species) in the HBx-mediated apoptosis, we utilized the KUGI microarray that contains about 13K human gastric tissue cDNA clones to examine the gene expression profiles in either Chang liver cell line expressing HBx or control cell line. The microarray results showed one of antioxidant genes was highly down-regulated in HBx-expressing Chang liver cells. The down-regulated gene expression was validated through semi-quantitative RT-PCR. We also found that another anti-oxidant gene expression was down-regulated in the HBx-expressing Chang liver cells when compared with control cells. Our findings are consistent with the hypothesis that ROS-mediated apoptosis of HBV-infected hepatocytes may be a main event in viral hepatitis. We are now examining the mechanism(s) for down-regulation of anti-oxidant gene expression by HBx and the relationship between the down-regulation of the anti-oxidant genes and the HBx-mediated cell death.

Persistent infection with hepatitis B virus (HBV) is a leading cause of human liver disease and is associated with hepatocellular carcinoma, one of the most prevalent forms of human cancer. Among four gene products of HBV, HBxAg, a protein of approximately 154 amino acids has been detected with high frequency in liver cells from patient with chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer and might be a prime candidate for mediating the pathological effects of HBV. In order to isolate the novel genes which are related to HBx functions, yeast two-hybrid analysis, DD-PCR analysis and promoter binding assays were used. We isolated different genes which are influenced by HBx. We categorized the isolated genes into three groups : the genes which are involved in mitochondrial physiology, transcriptional acetylations and promoter binding. Each of the novel HBx-response gene products are assayed for their functions in relation to the HBx function. These results will provide the experimental rationale in investigating HBx

functions in rapidly renewing tissue, as in hepatocellular carcinoma.

The aim of this study is to evaluate the immunogenetic and virological factors affecting various clinical outcomes especially progression to liver cancer after HBV infection.

We studied a total of 370 patients, and they were classified into four groups according to the status of the various status of HBV infection: 1) Unexposed group (UE) [HBsAg, Anti-HBc negative], 2) Spontaneous clearance group(SC) [HBsAg negative, Anti-HBc and Anti-HBs positive], 3) non-progression group(NP) [HBsAg positive, HBeAg negative, normal transaminase], 4)Progression group(PR) [HBsAg positive & chronic hepatitis /cirrhosis /hepatocellular carcinoma]. HLA-DR genotyping was performed with ELPHA DRB high resolution technique, and the TNF- α promoter polymorphism and MBL codon 54 mutation were tested by ABI Prism SnaPshot ddNTP Primer Extension Kit. As the results, TNF- α promoter polymorphism at -308(G to A transition) was observed in 22/84(26.2%) patients in SC group, which was significantly more frequent compared with UE (7/60, 11.7%), NP (2/66, 3.0%) and PR (11/160, 6.9%)($p < 0.001$). HLA-DRB1*13 is associated with the clearance of HBV infection(UE:13/60(21.7%), SC: 18/84(21.4%), NP: 2/52(3.8%), PR:12/159(7.5%). ($p = 0.001$) The MBL gene mutation and TNF- α promoter polymorphism at -238 didn't showed significant different distribution in divided four groups. The genetic association was also noted between TNF- α promoter polymorphism at -308 and HLA-DRB1*13(TNF- α promoter polymorphism at -308 & HLA-DRB1*13 both positive: 44.4% vs TNF- α promoter polymorphism at -308 negative and HLA-DRB1*13 positive: 7.1%). ($p < 0.001$) These association was also observed but weakly between MBL gene mutation and HLA-DRB1*13.

We characterized the HBIG and lamivudine-resistant HBV. Sequencing analysis of full-length viral genome revealed many mutations in the basal core promoter, the precore region, the polymerase (L426I/L526M/M550I triple mutation), and D144E mutation in the 'a' determinant of HBsAg. Our study suggests that mutations in the HBsAg (D144E) and the polymerase (L426I/L526M/M550I) of HBV genome act synergistically to thwart lamivudine therapy and HBIG prophylaxis. In conclusion, the TNF- α promoter polymorphism at position -308 and HLA-DRB1*13 were associated with the clearance of HBV infection. However, important genetic association was also suspected between HLA-DRB1*13 and TNF- α promoter polymorphism at -308/HLA-DR B*13. Therefore, immunogenetic factors may have a role in the clinical outcome after HBV infection. Our result can play an important role in our understanding of diverse clinical outcomes or therapeutic responses.

C O N T E N T

PART 1 : Search for and functional analysis of cellular genes associated with hepatitis C virus

1. Introduction -----	23
2. Research Trends -----	26
3. Research Contents and Results -----	28
4. Achievements and Contributions -----	81
5. Conclusions and Future Plans -----	86
6. Science & Technology Information -----	88
7. References -----	90

PART2 : Systemic search for and functional analysis of cellular proteins interacting with liver-cancer-inducing viral proteins

1. Introduction -----	93
2. Research Trends -----	94
3. Research Contents and Results -----	97
4. Achievements and Contributions -----	123
5. Conclusions and Future Plans -----	124
6. Science & Technology Information -----	124
7. References -----	125

PART3 : Search for and analysis of novel genes related to liver cancer caused by hepatitis B virus using retroviral cDNA expression library/proviral tagging system

1. Introduction -----	129
2. Research Trends -----	130
3. Research Contents and Results -----	131
4. Achievements and Contributions -----	145
5. Conclusions and Future Plans -----	146
6. Science & Technology Information -----	146
7. References -----	147

PART4 : Search for and functional analysis of novel genes related to liver cancer caused by hepatitis B virus

1. Introduction -----	149
2. Research Trends -----	150
3. Research Contents and Results -----	153
4. Achievements and Contributions -----	177
5. Conclusions and Future Plans -----	178
6. Science & Technology Information -----	179
7. References -----	181

PART5 : Identification of immunogenetic factors in liver cancer associated with hepatitis B virus

1. Introduction -----	183
2. Research Trends -----	189
3. Research Contents and Results -----	190
4. Achievements and Contributions -----	194
5. Conclusions and Future Plans -----	195
6. Science & Technology Information -----	195
7. References -----	196

목 차

제 1 부 : C형 간염바이러스에 의한 간암관련 유전자 발굴 및 기능분석

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	28
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	81
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	86
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	88
제 7 장 참고문헌 -----	90

제 2 부 : 간암유발 바이러스 단백질군과 상호결합하는 숙주 세포단백질군의 체계적인 발굴 및 기능연구

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	93
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	94
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	97
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	123
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	124
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	124
제 7 장 참고문헌 -----	125

제 3 부 : Retroviral cDNA expression library/Proviral tagging을 이용한 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 분석

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	129
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	130
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	131
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	145
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	146
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	146
제 7 장 참고문헌 -----	147

제 4 부 : B형 간염 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석에 관한 연구

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	149
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	150
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	153
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	177
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	178
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	179
제 7 장 참고문헌 -----	181

제 5 부 : B형 간염 바이러스의 간암발생의 면역유전학적 인자규명

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	183
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	189
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	190
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	194
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	195
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	195
제 7 장 참고문헌 -----	196

제 1 부

C형 간염 바이러스에 의한 간암관련 유전자 발굴 및 기능 분석

주관연구기관 : 한국생명공학연구원

연구책임자 : 임 동 수

연구원 : 정 초 록
최 시 영
조 원 경
황 경 선
유 진 상
이 선 우

제 1 장 연구개발과제의 개요

C형 간염 바이러스: HCV는 수혈에 의해 전염되는 바이러스 (non-A, non-B hepatitis virus)로서 1989년에 그 실체가 규명되었고 HCV에 관한 지금까지의 연구결과들은 이 바이러스가 만성 간염을 일으키고 장기간의 간에서의 잠복기를 거쳐 간경화, 간암의 원인이 되는 것으로 국내외적으로 입증되고 있다. 국내에서 헌혈자의 1% 정도가 HCV 양성으로 판명되는 것으로 보아 국내인구 100명당 1명 정도가 HCV를 보유하고 있는 것처럼 보인다. 전세계적으로 anti-HCV 양성인 사람이 1억7천만명으로 보고되고 있으며, 지역적으로 차이가 있으나 일본, 미국, 러시아, 프랑스, 동구제국, 인도지역에서는 전인구의 약 1-2.4%, 몽고, 에집트등에서는 전인구의 10% 이상, 중국, 브라질등은 전인구의 2.4-4.9%의 감염율을 보이고 있다. 독일, 영국, 북구제국, 호주, 캐나다등에서는 1% 미만 인구에서 anti-HCV양성으로 나타나고 있다. C형 간염바이러스에 의한 만성 간염이나 간경화환자의 자연경과를 추적 조사한 간암의 발생위험에 관한 국내 조사 결과는 간경화 환자는 만성 간염 환자보다 간암에 걸릴 위험이 3.1배 높으며 C형 간염 보유자는 기타 간염 환자보다 간암에 걸릴 위험이 2.2배 높은 것으로 나타나고 있다. 국내에서 C형 바이러스에 의한 간염의 경우 3년, 6년후의 간암의 누적발생율이 각각 22.0%, 54.8%, 연간 간암발생률은 9.0%였다. 국내에서 100예 이상의 원발성 간암을 대상으로 한 연구에서 전체 간암환자중에 anti-HCV 양성률은 16.6% (10.8-22.4%)이었고 HBV 음성인 환자에서의 anti-HCV양성은 48.8-68.5%로 나타났다. 60대이후의 간암환자의 79.6%에서 anti-HCV 양성인 것으로 보아 고령에서 HCV와 관련된 간암이 유의성 있게 빈발하는 것처럼 보인다. 따라서 60대이후의 간암의 원인인자로서 HCV가 관여하는 것으로 볼 수 있다. HCV 감염이 수혈에 의해 일어나며 1989년에 비로소 수혈에 의한 HCV 감염을 예방할 수 있게 되어 1989년 이전에 수혈받은 사람들중에 상당수의 간암환자가 발생할 것으로 예측된다. 최근 연구결과는 HCV 감염이 수혈에 의해서 뿐만이 아니라 약물남용자들에게 의해 전파되는 것으로 알려진 바 HIV와 같은 일종의 선진국형 바이러스로서 HCV 감염에 의한 간암환자의 발생은 증가하고 있고, 증가할 것으로 보인다. 따라서 HCV에 의한 간암발생에 직간접적으로 관여하는 세포 인자의 발굴 및 기능 규명연구는 간암 예방 및 치료기술개발에 초석이 될 수 있다.

HCV는 단일가닥의 (+)RNA 바이러스로서 약 10 kb의 유전체 크기를 갖는다. HCV로 감염된 세포에서는 3010개의 아미노산을 갖는 단일 polyprotein이 만들어지고, 이 단일 polyprotein은 세포가 갖고 있는 단백분해효소 (cellular signalase)와 바이러스가 갖고 있는 단백분해효소에 의해 분해되어 9-10 종류의 core, E1, E2/p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B들이 생성된다. Core, E1, E2 단백질은 이 바이러스의 구조 단백질로서 core 단백질은 nucleocapsid를 형성하고, E1, E2 단백질은 외피당단백질로서 바이러스외곽을 감싸고 있다. 비구조 단백질 (nonstructural protein: NS)들은 바이러스 복제에 관여할 것으로 추정되고 있으며, NS2단백질은 NS2-NS3를 분해하고 NS3 단백질은 serine protease활성을 갖고 있어

NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B 사이를 분해한다. HCV를 배양세포에서 증식시킬 수 있는 효과적인 감염배양계가 없기 때문에 각각의 단백질들의 기능은 대장균, 포유동물의 과량 발현체계를 이용하여 분석되고 있다. 상당히 많은 HCV 단백질들의 생화학적 기능이 분석된 결과, NS2, NS3 단백질은 단백분해효소 활성을 갖고 있으며 NS4A 단백질은 NS3와 복합체를 형성하여 NS3 단백질의 단백분해효소 활성을 촉진하는 기능이 있는 것으로 밝혀졌다. NS3 단백질이 RNA helicase 활성도 갖고 있음이 규명되었다. NS5A 단백질은 인산화되며 세포내 protein kinase regulator (PKR)와 결합하여 HCV의 인터페론내성유발과 관련되어 있음이 보고되었다. NS5B 단백질은 RNA 의존성 중합효소로서 밝혀졌다.

이러한 여러 HCV 단백질들중에 지금까지 밝혀진 HCV에 의한 간암발생에 원인이 되는 것으로 추정되는 HCV 유전자들은 core, NS3, NS4B, NS5A 로서 알려져 있다. 특히 Core 단백질을 이용한 형질전환 생쥐에서 간암이 유도되는 것으로 보고된 바 (1998) HCV에 의한 간암발생에 가장 직접적으로 관련되어 있을 가능성이 높은 것으로 생각되고 있다. 그러나 core 단백질이 어떻게 간암 발생에 관여하는 지에 대한 산발적이고 상반된 연구결과들이 보고되고 있다. Core 단백질과 직접적으로 결합하는 많은 세포인자들 (heterogenous ribonucleo-protein K, DEAD box RNA helicase, 14-3-3, bZIP nuclear transcription factor, lymphotoxin- β receptor, TNF- α receptor1의 cytoplasmic domain)의 대부분은 효모의 two-hybrid system에 의해 발굴되었다. Core와 세포인자들간의 상호작용에 의해 많은 세포 유전자들의 발현 및 이에 따른 세포인자들의 세포내 기능에 영향을 줄 것으로 예측되나 이러한 상호작용으로 비롯되는 세포 유전자들은 유전체 수준에서 규명된 바 없다. NS3 단백질과 직접적으로 결합하는 세포인자들은 PKA, PKC, histone, p53, protein arginine methyltransferase (PRMT)로서 밝혀졌으나 이들과 간암발생과의 상관성은 규명된 바 없다. NS4B 유전자를 Ha-ras oncogene과 함께 NIH3T3 세포주에 도입하였을 때 세포의 암화 (transformation)를 관찰하였으나 NS4B가 어떻게 하여 세포의 암화를 유도하는지에 관한 분자수준의 표적은 규명되지 않고 있다. NS5A과 직접적으로 결합하는 세포인자들로서 PKR, grab-2, SRCAP이 밝혀졌으나 이러한 상호작용과 간암발생과의 연관성은 규명된 바 없다.

상기한 바와 같이 HCV의 putative oncogene (core, NS3, NS5A)들과 결합하는 세포인자들이 규명되고 있으나 이들과의 상호작용에 의해서 영향을 받는 세포 유전자들이 유전체 수준에서 규명되지 않고 있다. 이러한 바이러스 유전자 산물과 세포신호 전달인자나 세포 전사조절인자간의 상호작용에 의해 upregulation 혹은 downregulation되는 세포 유전자들을 유전체 수준에서 발굴하여 그 기능을 규명하는 것은 배양세포내에서 발견된 현상이 실제로 간암발생과 관련성이 있는지의 유의성을 검증할 수 있게 한다. 유전체 수준에서의 HCV 유전자 산물에 의해 영향을 받는 간암관련 세포 유전자들을 발굴하기 위하여 transient expression을 강력하게 유도하는 아데노바이러스 유전자 전달체는 효과적인 수단이 될 수 있다. 최근에 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용하여 p53에 의한 조절받는 새로운 유전자들이 사람의 대장암 세포주에서 분리보고된 바 있으므로 HCV putative oncogene들이 도입된 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용한 유전체 수준에서의 간암관련 유전자들의 발굴은 가능할 것으로 보였다. 특히 아데노바이러스 유전자 전달체는 배양된 간세포뿐만이 아니라 생쥐의 간조직에 HCV putative

oncogene들을 전달할 수 있으므로 HCV 유전자 산물들에 의해 조절받는 간암관련 세포 유전자들을 일차적으로 배양된 간세포에서 검증하고 이들의 유의성을 생쥐 간조직에서 검증하여 HCV 관련 간암유발에 관여하는 세포 유전자들을 발굴할 수 있을 것이다. 이렇게 발굴된 유전자들의 기능은 배양세포에서의 정상세포의 암화능 (transformation) 검증을 통하여 분석될 수 있다. 배양 간세포와 생쥐 간조직에서 유의성있게 HCV putative oncogene들에 의해 변화되는 세포 유전자들이 암화에 관련되어 있다면 이들은 HCV에 의한 치료제 개발에 분자 표적이 될 수 있다. 특히 HCV 유전자 산물에 의해 upregulation 되는 세포 유전자들은 HCV에 의해 유도된 간암 세포들을 선택적으로 유전자로 치료하는데에 유용한 소재가 될 수 있다.

본 과제에서는 Core, NS5A에 의해 그 발현이 조절받는 세포인자들을 발굴하고 그 기능을 규명하여 간암발생의 원인을 분자세포수준에서 규명하고자 하였으며, NS3와 세포인자 (PRMT5) 간의 상호결합의 생물학적 기능과 그 의미를 이해하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

HCV가 인터페론에 대한 내성을 갖는 분자기전을 밝히는 연구에서 NS5A 단백질이 PKR (interferon induced double-stranded RNA-activated protein kinase)과 특이적으로 결합하는 것이 밝혀졌다. PKR은 인터페론에 의해 활성화되는 단백질로서 단백질합성 촉진인자 eIF-2 α 의 Ser-51을 인산화시켜 mRNA의 번역을 억제하고 세포의 성장을 저해하였다. PKR은 I κ B의 인산화를 유도하여 NF κ B 의존성 세포유전자들의 전사를 유도한다. PKR은 스트레스에 의한 세포사멸에 중요한 매개자로서 알려져 있으며 PKR 기능을 지속적으로 억제할 경우 세포의 암화를 유도하였다. PKR의 kinase 기능은 HCV E2 단백질에 의해 저해되었고 PKR의 단백질 합성 및 세포성장 저해기능을 차단하였다. HCV의 NS5A 유전자의 N말단에 존재하는 146개의 아미노산을 효모의 GAL4 DNA 결합부위에 융합시킨 융합 유전자는 효모와 간암세포주에서 강력한 전사 활성화를 유도하였다. NS5A 단백질은 세포주기 조절인자 p21^{WAF1} 유전자의 전사를 억제하였고, 생쥐의 fibroblast와 사람의 간암세포주에서 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 유전자를 활성화시켰다. 또한 NS5A 유전자가 발현되는 NIH3T3세포주는 anchorage-independent growth를 유도하였으며, nude mice에서 tumor nodule을 형성하였다. 효모의 two hybrid screen을 통하여 NS5A 단백질이 신규 세포내 전사조절인자 SRCAP와 결합하는 것이 밝혀졌다. NS5A에 의한 p21 프로모터의 전사억제는 SRCAP 유전자를 과량발현시켰을 때 down-regulation되었다.

HCV Core 유전자를 발암성 유전자 ras와 함께 primary rat embryo fibroblast (REF)에 도입하였을 때 REF가 형질전환(transformation)됨을 미국 연구팀(1996)이 밝힌 후, 국내 연구팀은 (1998)는 core와 ras 유전자가 REF 세포를 형질전환 시키지 못하나, Rat-1세포주를 형질전환시키며 이는 core유전자 발현량과 관련되어 있음을 밝혔다. 일본의 Koike K 연구팀(1998)은 core가 발현되는 transgenic mice에서 간암이 16개월만에 유도됨을 밝혀 HCV 유전자 중에 core 유전자가 암발생에 직접적으로 관여됨을 최초로 규명하였다. Core와 결합하는 많은 세포인자들 (heterogenous ribonucleoprotein K, DEAD box RNA helicase, 14-3-3, bZIP nuclear transcription factor, lymphotoxin- β receptor, TNF- α receptor1의 cytoplasmic domain)들이 규명되었다. 이 중 HCV 간암유발기전을 분자수준에서 규명한 연구는 core-LZIP 간의 interaction으로 LZIP nuclear transcription factor를 core가 세포원형질에 머물게하여 LZIP 기능을 불활성화시켜, 세포의 형질전환을 강화한다는 보고이었다. 세포의 성장과 사멸은 정상세포의 형질전환과 밀접한 관계에 있으므로 core 유전자가 발현되는 다양한 세포주 (HeLa, HepG2, HuH7, MCF7)들이 제작되어 TNF- α , anti-Fas antibody 등으로 처리하였을 때 세포주에 따라 세포사멸을 촉진시킨다는 연구결과와 세포사멸을 억제한다는 서로 상반된 연구결과들이 보고되고 있다. Core 유전자가 다양한 promoter에 영향을 주는 것으로 밝혀졌는데 p53 및 p21^{WAF1/Cip1/Sid1} promoter 활성이 core에 의해 억제되고, TNF- α 에 의한 NF-kappaB 활성을 억제하며, MAPKK와 JNK를 활성화시켜 AP-1을 활성화 시켰다. Core 단백질은 사람 간암세포주 Huh-7에서 HBV의 전사와 복제를 억제하였고 이는 PKA, PKC에 의해 조절받았으며 core

단백질의 ser-99, ser-116이 PKA, PKC에 의해 인산화되었다.

NS3 유전자의 N말단을 발현하는 NIH3T3 세포주는 빠른 증식을 보였고, contact inhibition이 없어졌으며, anchorage-independent growth가 일어났으며, nude mice에서 tumor nodule을 형성하였고, C말단이 제거된 NS3 단백질을 발현하는 NIH3T3 세포주는 actinomycin D에 의한 세포사멸을 억제하였고, NS3 유전자 산물의 세포핵내로의 이동은 p53에 의해 증가되었다. NS3 단백질은 cAMP의존성 protein kinase의 histone 인산화를 저해하였고, cAMP의존성 protein kinase의 catalytic subunit의 세포내 이동을 저해하였으며, histone과 결합하였고, protein kinase C (PKC)와 결합하여 세포내 PKC의 기능을 저해하였다.

본 과제에서 NS5A에 의해 그 발현이 조절받는 세포인자를 발굴하기 위해 NS5A유전자가 도입된 Ad.NS5A 유전자 전달체가 제작되었고, NS5A가 항시 발현되는 2종의 헬라세포주가 제작되어 NS5A에 의해 조절받는 수종의 세포인자를 발굴하였다. 이중 RNA polymerase의 subunit 중의 하나인 POLR2K 유전자의 발현이 NS5A에 의해 억제되는 것을 발견하였다. NS5A에 의한 POLR2K 유전자의 발현억제 기전을 알아보기 위하여 POLR2K 유전자 발현조절부위의 cis-acting element를 조사한 결과 IRF-1(interferon regulatory factor-1) 결합부위가 존재하며, IRF-1 결합부위를 통하여 NS5A가 POLR2K의 발현을 억제하는 것을 발견하였다. NS5A에 의한 RNA polymerase의 subunit중의 하나인 POLR2K 유전자의 발현의 저하에 따른 숙주세포의 RNA polymerase II 활성의 저하는 일종의 바이러스에 의한 host metabolism shut-off 기전일 수 있다는 가설을 처음으로 제시하였다. 또한 세포의 RNA 중합효소가 인터페론에 의해 조절받을 수 있다는 가능성을 처음으로 제시하였다. 본 과제 수행을 통하여 Core에 의해 그 발현이 조절되는 3종의 세포인자를 발굴하여 core단백질에 의한 세포의 암화과정을 분자세포 수준에서 이해할 수 있는 소재를 발굴하였다. NS3에 의한 세포의 암화과정을 이해하기 위해서 NS3와 세포단백질(PRMT5)와의 상호결합의 생물학적 의미를 조사하였다. PRMT5는 단백질의 arginine을 methylation시키는 효소로서 Jak kinase와 상호 작용하는 것으로 알려진 바 PRMT5와 Jak kinase와의 상호결합이 NS3단백질에 의해 저해되는 것을 발견하였다. PRMT5가 인터페론-Jak-STAT 신호전달계를 활성화시키며, 이 활성화과정에는 PRMT5의 methyltransferase 효소활성이 관여되어 있음을 발견하였다. 결국 NS3는 PRMT5의 인터페론 신호전달에 negative factor로서 작용하여 HCV가 숙주의 면역체계에서 생존하기 위한 전략일 수 있다는 가설을 제시할 수 있었다. 이러한 본 연구과제 수행으로 얻은 결과들은 국내외적으로 보고된 바 없는 새로운 사실들로서 국제적으로 경쟁력이 있는 연구수준으로 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. HCV NS5A 또는 Core에 의해 조절 받는 세포인자 발굴

(1) 실험에 사용된 세포주

Transient expression을 위한 transfection 및 reporter assay를 위해서는 HEK293 cell이 주로 사용되었다. 본 세포는 10% FBS가 포함된 low glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)로써 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다. 각종 Chang's liver, HepG-2, Huh-7 등의 hepatocarcinoma 세포는 재조합 아데노 바이러스 벡터를 이용한 HCV 단백질의 발현에 사용되었다. 본 세포는 10% FBS가 포함된 high glucose DMEM 로써 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

HCV NS5A 발현에 따른 세포내 분자의 변화를 알아보기 위하여 본 실험실에서는 NS5A가 항시 발현되는 세포주를 HeLa에서 제작하고 HeLa-NS5A라 명명하였으며, 대조 세포주로는 neomycin에 저항성만을 가진 세포주를 제작하고 HeLa-Neo라 명명하였다. 그 과정을 간단히 설명하면, CMV 프로모터를 가지고 있으며 neomycin에 저항성 및 Flag 표식인자를 가지고 있는 벡터에 NS5A를 클로닝하여 HeLa 세포주에서 transfection 하고 Neomycin으로 선별한 다음 NS5A 발현을 확인하고 (Fig. 1) 이후 실험에 사용하였다.

(2) HCV NS5A 유전자가 아데노바이러스 유전체에 도입된 Ad.NS5A 및 Ad. core 바이러스 제작 및 발현 검증

HCV NS5A 및 Core 단백질을 세포내에서 효과적으로 발현할 수 있도록 하기 위하여 아데노 바이러스 벡터를 이용하여 Ad.NS5A 와 Ad.Core를 제작하였다. 간단히 설명하면 pxdCMV-Flag/NS5A 벡터 또는 Core를 가지고 있는 벡터를 pBHG10를 동시에 293 cell에 transfection하여 in vivo homologous recombinant에 의해 만들어진 바이러스가 plaque를 형성할 때 분리하고 증폭시켰다. 만들어진 아데노 벡터의 발현은 Chang's liver, HepG-2, Huh-7 등의 hepatocarcinoma cell에서 100 MOI의 Ad.NS5A 및 Ad.Core를 transduction 시키고 NS5A의 경우는 anti-Flag antibody으로 Core의 경우는 anti-Core antibody를 이용한 Western blot 으로써 확인하였다 (Fig. 1).

(3) 생쥐 간 조직에서의 NS5A 및 Core에 의해 조절받는 세포유전자의 발굴

아데노바이러스 유전자 전달체의 생쥐의 꼬리정맥 주사를 통하여 NS5A유전자를 간조직

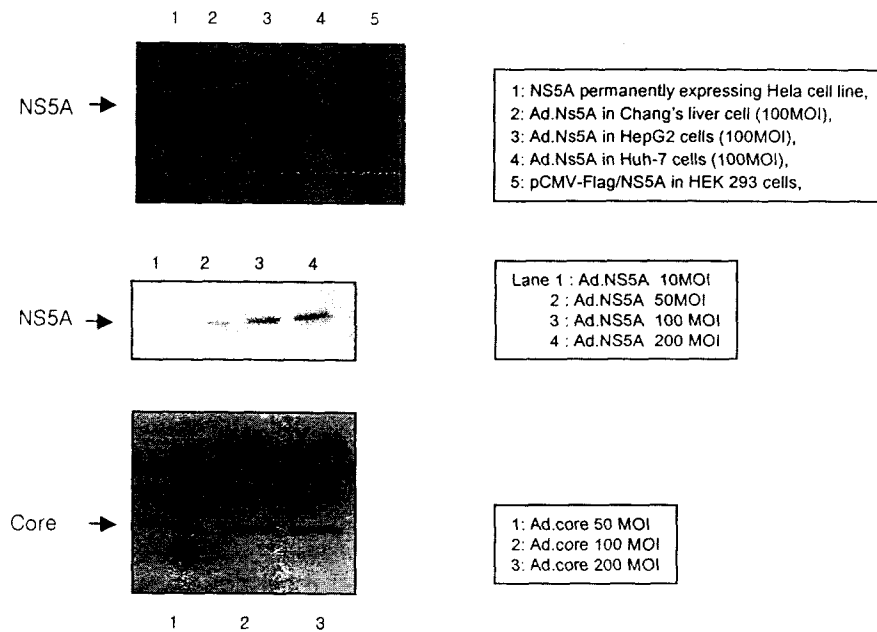


Fig. 1. Western blot analysis showing that NS5A and Core are expressed in Ad.NS5A and Ad.Core viruses-transduced cells.

Hepatocarcinoma cells were transduced with Ad.NS5A or Ad.Core. Or HEK293 was transfected with pCMV-Flag-NS5A. At 48 hr posttransfection, the cells were harvested and disrupted using lysis buffer. The presence of Flag-NS5A or core in the soluble protein extracts was detected by Western blots with anti-Flag or anti-core antibodies.

에서 발현시켜 NS5A에 의해 그 발현이 조절받는 세포 유전자를 생쥐의 간에서 발굴하고자 하였다. In vivo 실험용 재조합아데노바이러스를 분리정제하기 위해 재조합 아데노바이러스들을 293세포에 5 MOI로 감염시키고, 24-48시간 후에 배양액과 세포주들을 수확하였다. 바이러스를 세포에서 유리시키기 위하여 Freezing(-70°C)-thawing을 한 후, 초음파로 처리하고 바이러스 함유 추출물을 얻은 후 2회에 걸친 CsCl₂ 초원심분리를 통하여 바이러스를 정제하였다. 정제된 바이러스의 타이터를 293 세포주에서 플라크 assay를 통하여 검증한 결과 Ad.NS5A의 경우 1.5 x10¹⁰ pfu/ml, Ad.GFP (control 바이러스)의 경우 1.5 x10¹¹ pfu/ml를 이었다. 분리 정제된 Ad.NS5A 바이러스를 꼬리 정맥을 통하여 주사하였을 때 10¹⁰ pfu의 경우 생쥐가 사망함을 발견하여 아데노바이러스 최적 투여용량을 우선적으로 결정하였다. 정제된 재조합 아데노바이러스들의 다양한 pfu(plaque forming unit)를 PBS에 희석하여 전체 용량 200ul 를 7주된 수컷 생쥐(BALB/c)의 꼬리정맥에 접종하여 최적 투여 용량을 정하였다, 그 결과 Ad.NS5A의 경우 5X10⁸ pfu가 최대 투여용량으로 나타났다. Ad.NS5A 및 Ad.GFP를 생쥐꼬리 정맥에 투여한 후 NS5A 및 GFP의 발현을 생쥐 간조직에서 immunobloting, RT-PCR등의 방법으로 확인하였다. 바이러스 투여후 3일 후에 생쥐 간조직을 paraffin section을 한 다음, H&E staining을 수행하였을 때 간 조직에 특이한 이상현상은 발견할 수 없었다. Ad.NS5A 및 Ad.GFP를 생쥐꼬리 정맥에 투여한 후 도입된 유전자들의 발현을 확인한 후, 생쥐 간조직을 분리하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 P³²로 표지하고 생쥐 유래 Atlas cDNA expression microarray를 수행한 결과 Ad.NS5A 및 Ad.GFP간의 차이를 발견할 수 없었다. 생쥐 간 조직의 단백질 추출액을 얻은 후 2-D 분석을 통하여 단백질들의 차이를 조사한 결과 Ad.NS5A 및 Ad.GFP로 처리한 시료에서 차이를 발견할 수 없었다.

아데노바이러스 유전자 전달체를 이용하여 생쥐 간에서 core에 의해 조절받는 세포 유전자를 발굴하기 위하여 Ad.core 및 Ad.GFP를 분리정제하였다. 구체적으로 재조합 아데노바이러스를 분리정제하기 위해 재조합 아데노바이러스들을 293세포에 5 MOI로 감염시키고, 24-48시간 후에 배양액과 세포주들을 수확. 바이러스를 세포에서 유리시키기 위하여 Freezing(-70°C) & thawing을 한 후, 초음파로 처리하고 바이러스 함유 추출물을 얻은 후 2회에 걸친 CsCl₂ 초원심분리를 통하여 바이러스를 분리정제하였다. 정제된 바이러스를 293 세포주에서 플라크assay를 통하여 그 타이터를 정한 결과 Ad.Core의 경우 1.5x10¹¹pfu/ml, Ad.GFP (control 바이러스)의 경우 1.5 x10¹¹ pfu/ml 이었다. Ad.Core의 최적 생쥐투여용량을 결정하기 위하여 생후 7 주령의 생쥐 한 마리당 4X10⁸, 4×10⁹, 3x10¹⁰ PFU 의 재조합 바이러스를 꼬리 정맥으로 투여한 결과, 3X10¹⁰ PFU의 재조합 바이러스를 투여한 생쥐는 모두 36시간째에 사망하였고, 4×10⁹ PFU 이하의 재조합 바이러스를 투여한 경우에는 투여 후 3일째까지 생존하였고, 3일째에 생쥐를 희생시

켜 간조직의 병리조직학적 변화를 관찰한 결과, 전반적으로 간실질세포의 세포핵 크기가 증가하고 세포질의 vesicular change가 관찰되었다 (Fig. 2). 이러한 변화는 재조합 Ad.GFP나 재조합 Ad.Core를 투여한 경우에 있어 유사하게 관찰되어 바이러스 벡터 효과일 것으로 추정되었다. 4×10^8 PFU의 Ad.core 바이러스를 투여한 경우에는 비교적 정상적인 병리조직학적 소견을 나타내었다. 이러한 실험결과는 4×10^9 PFU의 아데노바이러스를 생쥐정맥 내 주사로 투여하고 3일 후에 간조직을 얻어 실험에 사용할 수 있음을 알 수 있었다. Ad.Core 및 Ad.GFP를 생쥐꼬리 정맥에 투여한 후 생쥐 간조직을 분리한 후 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 P^{32} 로 표지하고 생쥐 유래 Atlas cDNA expression microarray를 수행한 결과 Ad.core 및 Ad.GFP간의 차이를 발견할 수 없었다. 생쥐 간조직의 단백질 추출액을 얻은 후 2-D 분석을 통하여 단백질들의 차이를 조사한 결과 Ad.core 및 Ad.GFP로 처리한 시료에서 차이를 발견할 수 없었다.

(4) DNA chip을 이용한 NS5A에 의해 조절되는 세포내 유전자들의 발굴

DNA chip을 이용하여 NS5A에 의해 조절받는 세포유전자를 발굴하기 위하여 Ad.NS5A를 transduction한 Chang liver cell의 total RNA를 추출하여 (Fig. 3), Cy3(red)로 label 하고, Ad.GFP를 infection한 Chang liver cell의 total RNA를 추출하여, Cy5(green)으로 label하였다 (Fig 4-5, total RNA quality). Cy5-labeled NS5A total RNA와 Cy3-labeled GFP total RNA를 동량 혼합한 후, 혼합액을 DNA chip (인간유전체사업단에서 제작된 2.3K DNA chip)에 떨어뜨리고 hybridization 후, Scanner를 사용하여 scanning과 normalization을 한 다음, MAAS program에서 Cy3:Cy5의 ratio를 측정하였다. Cy5와 Cy3의 image를 overlapping한 후, data 분석을 한 결과, 4배 이상 down-regulation된 gene의 profile을 1차적으로 얻었다 (Table 1). 이들 중 일부를 northern blot으로 검증한 결과 1-8U라는 유전자가 Ad.NS5A로 transduction된 세포주에서 repression되어 있는 것을 발견하였다.

(5) 2D-electrophoresis를 이용한 세포내 유전자들의 발굴

HCV NS5A 또는 Core 단백질에 의해 조절되는 세포내 유전자를 단백질 수준에서 탐색하기 위하여 2D-electrophoresis를 실시하였다.

NS5A의 경우는 NS5A 발현 HeLa-NS5A 세포주와 HeLa-Neo 세포주를 수거하여 실험하였으며, Core의 경우는 Ad.Core를 Chang's liver cell에 transduction (100 MOI)하고 대조군으로는 Ad.GFP (100 MOI)를 transduction 시킨 세포를 사용하였다. 수거된 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 두 번 세척하고 1mM PMSF and 1mM EDTA가 포함되어 있는 20mm Tris buffer (pH 7.5) 에 현탁 하고 sonicator (SONIFER, Branson)

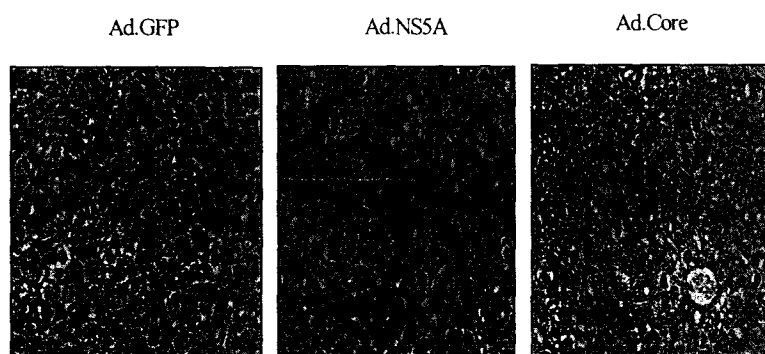


Fig. 2. H&E staining of liver tissues of mice injected with Ad.GFP, Ad.NS5A, or Ad.core via tail vein.

Ad.NS5A, Ad.Core, or Ad.GFP were injected into tail vein of Balb/C mice at 5×10^8 pfu (plaque forming unit). At 72 hours postinjection, livers were removed aseptically. Liver tissues were stained with H&E.

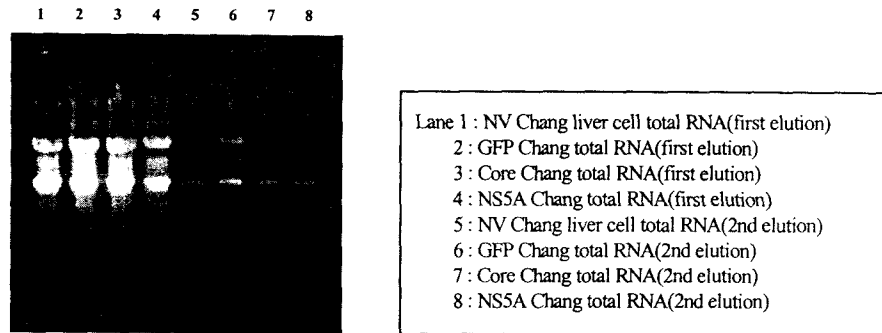


Fig. 3. The RNAs prepared for DNA chip analysis were intact.

Total RNAs were extracted from Chang liver cells transduced with Ad.NS5A, Ad.core, or Ad.GFP. The RNAs were used for gene expression analyses using 2.3k DNA chip.

Table 1 Candidate genes down-regulated by the NS5A in DNA chip analysis

Log ratio	spot name.
-3.414	chromosome X open reading frame
-3.116	Annexin A7
-2.953	KIAA0678 protein
-2.580	dolycyl-phosphate mannosyltransferase
-2.408	cytochrome b5(partial)
-2.345	vesicle-associated membrane protein 4
-2.258	asparagine synthetase
-2.243	?
-2.242	H2A histone family member Y
-2.222	homeobox gene
-2.192	interferon α inducible protein(cloneIF1-6-16)
-2.175	?
-2.170	profilin 2
-2.169	dynactin light chain
-2.136	pyruvate kinase(liver & RBC)
-2.120	guanine nucleotide regulatory protein(oncogene)
-2.119	transducin-like enhancer of split 4
-2.116	small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys)
-2.113	H3 histone family 3B(H3,3B)
-2.109	protocadherin 2(cadherin-like2)
-2.105	guanine nucleotide binding protein(G protein)
-2.097	kinesin family member 3C
-2.082	EST
-2.082	clone 23927 mRNA
-2.072	pre-T/NK cell associated protein
-2.059	tryptophan hydroxylase(tryptophan 5-monooxylase)
-2.056	potassium voltage gated channel
-2.045	actin dependent regulator of chromatin, subfamily
-2.045	ribosomal portien L15
-2.015	protein tyrosine phosphatase

로써 파쇄하였다. 12,000 rpm, 20 분 동안 원심분리하여 cell debris를 제거하고 4°C에서 한시간 동안 DNase I (100 ug/ml) 처리하였다. 상청액을 75,000 rpm으로 40분 동안 초원심분리 (TLA rotor, Beckman, USA)하여 상청액을 취하여 아세톤으로 농축하고 침전물은 8M urea, 4% Triton X-100이 포함된 UTT buffer에 녹였다. 단백질의 농도는 Bradford 법(Bio-Rad)으로 측정하고 약 35 ug/ul되도록 하여 실험에 사용하였다. 1mg의 단백질을 IEF buffer (Pharmacia) 와 rehydration buffer (Pharmacia)과 잘 혼합한 후 immobilized pH 3-10 linear gradient strip (18cm, Pharmacia, USA)에 loading하여 500V에서 12시간 rehydration후에 8000V 까지 voltage를 높여 IEF를 실시하였다. 이후 IEF strip을 다시 SDS-PAGE에 올려 전기영동을 실시하여 2차 전개하고 silver stain 하여 발현이 다른 단백질 spot을 검색하였다 (Fig. 4, 5). 위와 같은 조작을 3번 실시하여 재현되는 단백질 spot을 MALDI-TOF peptide analysis를 실시하여 분자를 identification하였다. 발현이 증가되는 것으로 기대되는 유전자들에 대하여 quantitative RT-PCR로써 일차 비교하고, 이 때 얻은 PCR 산물을 probe로 이용하여 여러 가지 조건에서 Northern blot을 실시하여 발현의 차이를 다시 확인하였다.

그 결과, NS5A에 의해 발현이 증가된 것으로 나타난 유전자는 NRF (NF κ -B repressing factor), Hsp 90 (Heats shock protein 90)등으로 나타났으며(Fig. 7 Table 2), Core에 의해 발현이 증가되는 유전자는 Cytochrome P 450, Neurofibromatosis, CDC-Kinase 3, Myelin transcription factor, TGS101 (Tumor susceptibility gene 101), KIAA1254, Ras-GRF2 이었으며, RT-PCR 및 Northern blot에서 유의성을 나타낸 것은 TGS101, KIAA1254, Ras-GRF2등으로 나타났다 (Fig 9, 10, Table 3).

(6) PCR-based cDNA subtractive hybridization 이용한 세포내 유전자들의 발굴

① cDNA subtractive hybridization

단백질을 강력하고 효과적으로 발현시킬 수 있는 재조합 아데노 바이러스 벡터 및 NS5A 발현 세포주, HeLa-NS5A 등을 이용하여 세포내에서 NS5A 또는 Core에 의해 조절 받는 세포내 유전자를 mRNA 수준에서 탐색하고 검출하고자 하였다. 세포주의 경우 NS5A 발현 세포주에서 tester cDNA를 HeLa-Neo 세포주에서 driver cDNA를 각각 분리 제작하였으며, Ad.Core의 경우는 Ad.Core를 transduction (100MOI) 시킨 Chang's liver cell에서 tester cDNA를 Ad.GFP를 transduction (100MOI) 시킨 Chang's liver cell에서 driver cDNA를 각각 분리 제작하였다. 그 과정을 간단히 설명하면 아래와 같다.

각 세포에서 만들어진 tester 혹은 driver cDNA를 *RsaI* 제한효소로써 절단하고 tester cDNA 양 말단에 각기 다른 adapter를 ligation하여 준비한다. 여기에 driver cDNA를 넣어 hybridization하여 NS5A에 의한 발현이 증가한 유전자 (Forward)만을 adapter specific

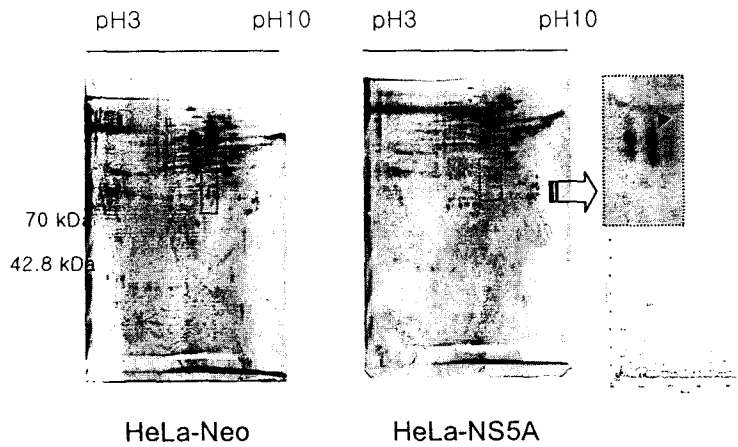


Fig. 4. 2-D gel proteome analysis of NS5A expressing cell line.

Soluble lysates of HeLa-NS5A and HeLa-Neo cells were concentrated and resuspended in UTT buffer (8M urea, 4% triton X-100, 40mM Tris, pH 7.5) for IEF and 2-D gel electrophoresis. An arrow indicates the protein spot induced by the NS5A.

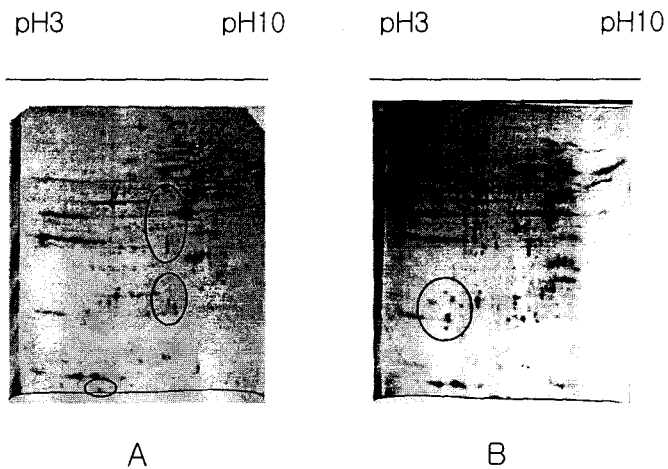


Fig. 5. 2-D proteome analysis of the cells transduced with Ad.Core.

Soluble lysates of Ad.core virus-transduced cells were concentrated and resuspended in UTT buffer (8M urea, 4% triton X-100, 40mM Tris, pH 7.5) for IEF and 2-D gel electrophoresis. A, Ad.Core; B, Ad.GFP; Circles indicates the regions in which the protein spots were detected differentially in Ad.core-transduced cells compared with Ad.GFP-transduced cells.

PCR로써 탐색하였으며, 발현이 감소한 (Reverse) 유전자를 탐색하기 위해서는 driver cDNA에 adapter를 ligation하여 동일한 방법으로 수행하였다.

② Differential screening

PCR based cDNA subtraction에서 얻어진 up regulation (Forward clones) 혹은 down regulation (Reverse clones) 된 유전자들을 T vector(Topo-2.1, Invitrogen)에 cloning하여 differential screening을 실시하여 변화의 유의성을 확인하였다. 간단히 설명하면, Forward cDNA pool에는 존재하면서 reverse cDNA pool에는 존재하지 않고, 혹은 그 반대의 경우인 clones들을 colony dot southern blot을 이용하여 검출하였다 (Fig. 6).

③ Northern blot analysis

Differential screening에서 얻어진 유전자들의 변화를 다시 Northern blot을 통하여 검증하였다. Ad.NS5A 혹은 Ad.GFP가 transduction (100MOI) 된 Chang's liver cell 및 HepG-2, Huh-7로부터 total RNA를 분리하였으며, pCMV-Flag/NS5A 혹은 UF3-Core를 transfection 시킨 HEK293 세포로부터 total RNA를 분리하여 25ug/well 의 RNA를 MOPS buffered based agarose 전기영동을 실시하였다. 전개된 RNA를 membrane (Hybond N+, Amersham)에 capillary transfer 시키고 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP로써 표시된 각각의 clone에서 분리된 plasmid를 probe로 사용하여 65°C, 16시간 hybridization 하였다. 0.2 X SSC, 0.2% SDS가 포함되어 있는 washing solution으로 30분-1시간 세척 후 BAS reader (1500, FUJI)로써 분석하였다.

PCR-based subtractive hybridization으로 NS5A에 의해 조절되는 세포내 유전자를 발굴한 결과, up regulation되는 유전자로는 ATP synthase, Enolase, GADPH, Cytochrome oxidase II, Lactate dehydrogenase등이 있었으며, down regulation되는 유전자에는 Thymosin, Beta2 microglobulin, POLR2k, Transmembrane super family 4, Phospholipase A2 등이었다 (Fig. 7, Table 2). 위의 유전들은 각각의 유의한 차이를 보였으나, 특히 RNA polymerase II polypeptide K (POLR2k)는 NS5A에 의해 현저히 그 발현이 저해되는 것으로 나타났으며, NS5A에 의한 POLR2k의 조절은 몇 종의 hepatocarcinoma cell line에 Ad.NS5A가 도입되었을 때도 확인되었다 (Fig. 8)

Core의 경우에는 Cytochrome C oxidase subunit 1, Cabamoyl phophate synthetase 1, Protein phosphatase 1, Signal peptidase spc 22/23, Beta2 Microglobulin, , HLA-B, RP11-292913 등의 유전자들의 up regulation 되어 있는 것으로 나타났으며, MDM2, Annexin A2, H2A histone family member Z, SET translocation, RP11-77n9 , Rp11- 713019, Rp11-452f10, SMAP42등의 유전자들이 down regulation 되어있는 것으로 나타났다 (Table. 3) 그러나 Northern blot의 방법으로는 유전자의 의미 있는 발현 조절을 관찰할 수는 없었다.

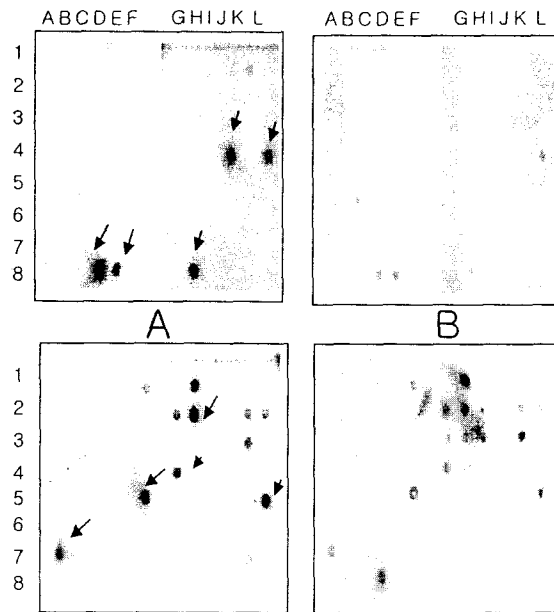


Fig. 6. Colony dot blot for differential screening of the subtracted clones.

Forward subtracted library; A, colonies were hybridized with forward subtracted probes; B, colonies were hybridized with reverse subtracted probes. *Reverse subtracted library*; C, colonies were hybridized with reverse subtracted probes; D, colonies were hybridized with forward subtracted probes. Arrows indicate the positive clones.

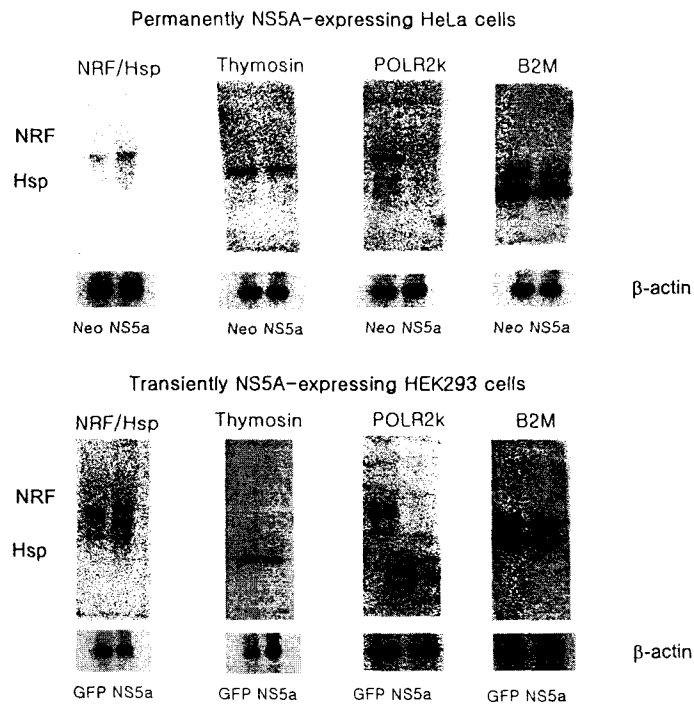


Fig. 7. Northern blot analysis of genes modulated by NS5A.

To confirm differential expression of the candidate clones, Northern blots were performed by each candidate gene as probe. Each lane contains 30ug of total RNA from HeLa-Neo and HeLa-NS5A cells. The NS5A or GFP expression vectors were transfected into HEK293 cells, and then same procedures were performed.

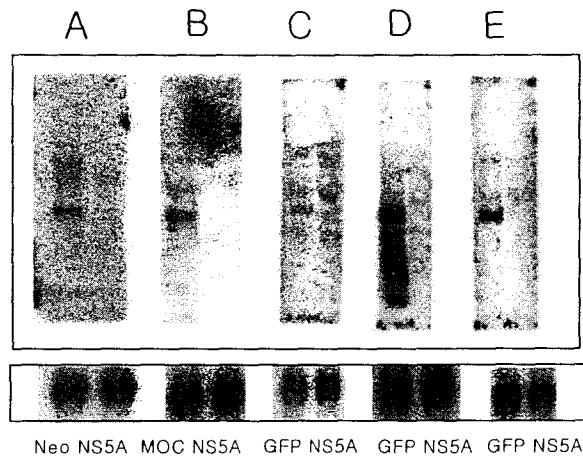


Fig. 8. POLR2K was down-regulated by NS5A.

Northern blot was performed to determine whether for analysis of expression of NS5A represses gene expression of POLR2k in various cells. A, HeLa cells constitutively expressing NS5A; B, HEK293 cells transiently expressing NS5A; C-E, Huh-7, HepG2, or Chang liver cells transduced with Ad.NS5A or Ad.GFP as a control.

Table 2. Candidate Genes modulated by the NS5A.

NS5A inducible genes candidates

Gene	Location
ATP synthase	E-8
Enolase 1	D-8
GADPH	H-8
Cytochrom oxidase II	J-4
Lactate dehydrogenase	L-4
NRF	2D spot
Hsp90	2D spot

NS5A reducible genes candidates

Gene	Location
Thymosin	F-5
Beta2 microglobulin	A-7
RNA polymerase II polypeptide K (POLR2K)	G-1
Transmembrane super family 4	H-2
Phospholipase A2	L-6

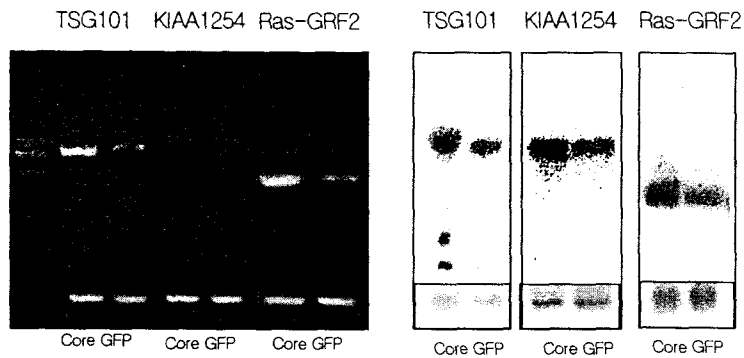


Fig. 9. Differential screening for the candidate genes induced by the Core.

Quantitative RT-PCR and Northern blots were performed to determine whether the candidate genes were differentially expressed in Chang liver cells transduced with Ad.core compared with Ad.GFP. Left panel; quantitative RT-PCR. Right panel; Northern blot analyses performed with ^{32}P radiolabeled RT-PCR products as probes.

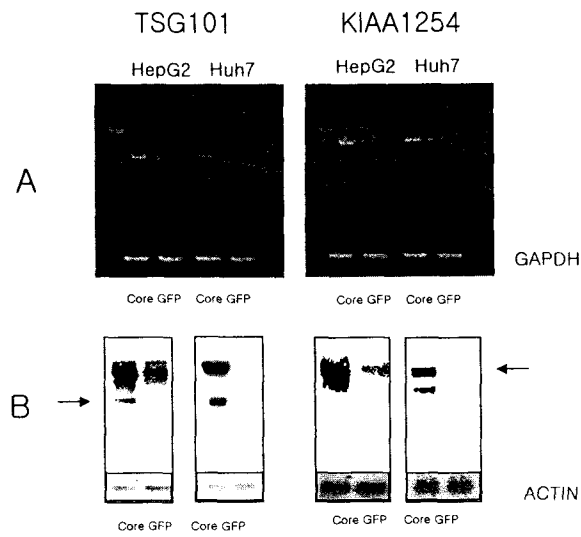


Fig. 10. TSG101 and KIAA1254 were induced by Core in hepatocarcinoma cells.

HepG2 and Huh-7 cells were transduced with Ad.Core. And then differential expression of the candidate genes was confirmed using quantitative RT-PCR and Northern blot. A, quantitative RT-PCR. B, Northern blots were performed with ^{32}P radiolabeled RT-PCR products as probes.

Table 3. The candidate genes modulated by the HCV Core

<i>Core inducible genes candidates</i>	
2-D electrophoresis	Subtractive hybridization
Neurofibromatosis	Cytochrome C oxidase subunit 1
Cytochrome P 450	Cabamoyl phophate synthetase 1
Ras-GRF2	Protein phosphatase 1
CDC-Kinase 3	Signal peptidase spc 22/23
Myelin transcription factor	Beta2 Microglobulin
KIAA1254	HLA-B
Tumor susceptibility gene 101	RP11-292913
<i>Core reducible genes candidates</i>	
2-D electrophoresis	Subtractive hybridization
PML protein	MDM2
	Annexin A2
	H2A histone family member Z
	SET translocation
	RP11-77n9
	Rp11-713019
	Rp11-452f10
	SMAP42

2. NS5A에 의해 down regulation 되는 POLR2k의 세포내 기능 분석

PCR-based subtractive hybridization에서 NS5A에 의해 현저히 down regulation 되는 것으로 나타난 POLR2k의 HCV 감염에 있어서 기능을 밝히고자 다음과 같은 실험을 실시하였다.

(1) POLR2k 발현 조절 기작 규명 :프로모터 분석

NS5A에 의해 조절되는 POLR2k의 발현양상을 분석하기 위하여 POLR2k의 promoter를 클로닝하고 분석하였다. Sequences정보는 UCSC genome bioinformatics (USA)에서 얻었으며, computational 분석은 Genomatix software (Germany)을 이용하였다.

전체 -481에서 +705의 1200 base pair 염기서열을 luciferase gene을 포함하는 PGL2 basic vector (Promega) 클로닝하고, 발현 조절의 필수 부위를 찾기 위해 5' 말단으로부터 300 base pair 씩을 절단한 fragment (A; -201~+705, B; +99~+705, C; +439~+705)를 만들어 각각 PGL2 basic vector에 클로닝 하고 또한 -481에서 -172의 300 base pair부분을 SV40 minimal TATA가 포함된 PGL3 vector에 클로닝하고 5'300bp라 명명 하였다.

프로모터의 각부위를 포함하는 reporter gene으로 HEK 293 세포에서 luciferase 활성을 측정하였을 때, -481에서 -172의 300 base pair부분이 전체 프로모터 활성화에 필수 부위임을 알수 있었다 (Fig. 11).

프로모터의 cis/trnas-element를 Genomatix software (Germany) 이용하여 분석을 실시하였을 때 IRF-1 (interferon regulating factor 1) 부착 부위 즉, IRE가 (AATCAAGAGAAAGG) 존재한다는 것을 알고 IRE를 포함하는 -581부터 -172까지의 약 400 base pair부분을 PGL3 vector에 클로닝하고 5'400bp라 명명하였다. 또한 IRE deletion mutant를 제작하여 PGL3 vector에 클로닝하고 5'400MU라 명명하였다.

5'400bp와 5'400MU의 luciferase 활성의 차이를 HEK 293 세포에서 NS5A가 있는 조건과 없는 조건에서 각각 co-trnasfection 시키고, 24시간후 IFN- α 를 3, 30 300unit를 처리하고 다시 12시간 후에 세포를 수거하여 luciferase activity를 측정하였다. 결과, IRF-1/IRE가 deletion mutantdml 활성이 현저히 감소하는 것을 볼 때, IRF-1이 POLR2k 의 발현조절에 중요한 transcription factor로 사료되었다 (Fig. 12).

(2) NS5A에 의한 IRF-1의 발현 저해에 따른 POLR2k의 down regulation

NS5A에 의한 POLR2k 발현 저해 현상이 IRF-1에 의한 것으로 사료되어 IRE reporter gene (PGL2-IRE)을 이용한 reporter assay 및 Northern blot 방법으로 NS5A 발현시의 IRF-1 mRNA 의 변화를 관찰하였다. 간단히 설명하면 pCMV-NS5A와 UF2-GFP를

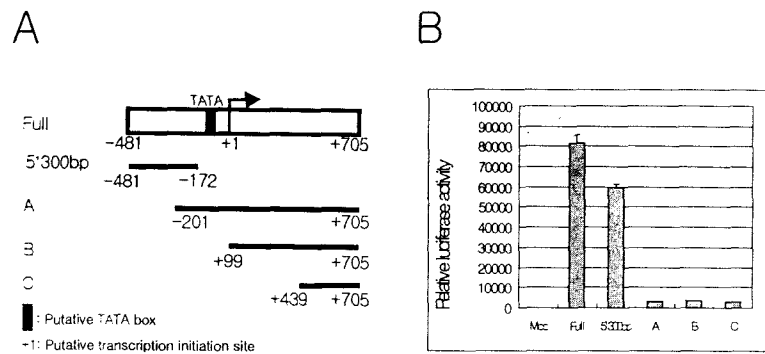


Fig. 11. 5'300 nt of the upstream region is essential for promoter activity of POLR2k.

A. The promoter region from -481 to +705 nt was cloned into PGL2 plasmid (Promega), named Full. Promoters with deletions of about 300 nucleotide (named A, B and C) from -581 to +705 nt position were serially constructed and cloned into a reporter plasmid containing luciferase as a reporter gene. The promoter region of the POLR2k from -481 to +172 nt (300) was cloned into the reporter gene containing SV40 minimal TATA box.

B. Each plasmid was transfected into HEK293 cells. At 24 hours posttransfection, the cells were harvested and luciferase activity was measured.

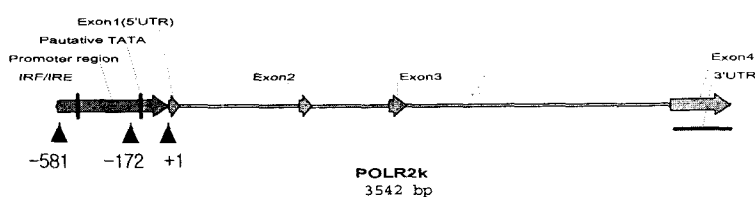
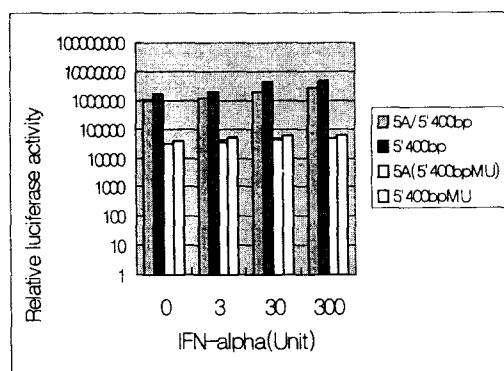


Fig. 12 IRF-1 binding site was essential for POLR2k promoter activity.

The region of POLR2k promoter from -581 to +172 nt (400 bp) was cloned into the reporter gene (named 5' 400bp) containing SV40 minimal TATA box. The POLR2k promoter with a deletion of IRF-1 binding sequence (CAAGAGAAAG) was cloned into PGL3 vector (5' 400bpMU). At 24 hours post co-transfection, cells were treated with IFN-alpha (3, 30, 300 U/ml) and then harvested, and measured luciferase activity at 12 hours posttreatment of IFN-alpha.

PGL2-IRE와 293 cell에 co-transfection 하고, 24시간후에 reporter assay를 실시하였다. 동시에 pCMV-NS5A와 UF2-GFP를 transfection 시킨 HEK293 cell로부터 total RNA를 분리하고 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP로써 표시된 MT7-mIRF1 로써 hybridization을 실시하였다. 그 결과, IRF-1의 발현이 NS5A에 의해 현저히 감소되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 13, 14).

이러한 결과를 근거로 고찰하여 보면 NS5A에 의한 POLR2k의 down regulation은 IRF-1의 down regulation에 기인한 것으로 사료되어지며, POLR2k는 IRF-1이 중심적으로 관여하는 interferon (IFN) 신호전달과정에 관여하고있을 것으로 조심스럽게 추측할 수 있었다. 또한 NS5A에 의한 이러한 down regulation은 HCV 감염에 있어 IFN 저항성을 유발할 수 있을 것으로 사료되어 졌다.

(3) POLR2k 발현 조절에 HCV 및 다른 단백질이 미치는 영향

POLR2k 발현 조절에 HCV 단백질 및 다른 단백질의 영향을 reporter assay 및 Northern blot으로써 관찰하였다.

Reporter gene으로는 POLR2k 프로모터의 full length가 들어있는 'Full'을 사용하였으며, HCV 단백질 발현 벡터로는 pCMV-Flag/NS5A, pCMV-Flag/NS3, UF3-Core과 비교 단백질로는 pCMV-Rep68, UF2-GFP, pCMV-PRMT1를 사용하였다. 'Full'과 각 plasmid를 HEK293 cell에 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하고 24시간 후 세포를 수거한 후 reporter assay kit (Promega)으로 luciferase를 측정하였다.

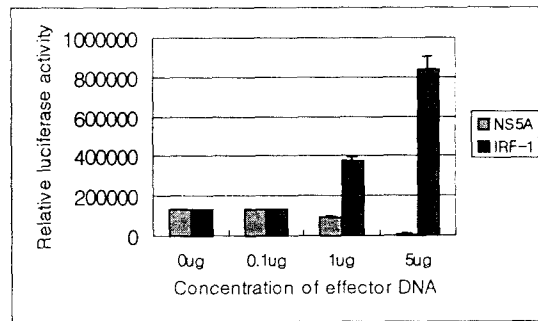
또한 POLR2k의 전사체 수준의 변화를 관찰하기 위하여 각 단백질이 발현되는 293 cell에서 total RNA를 분리하여 POLR2k에 대하여 Northern blot을 함께 실시하였다. 결과 POLR2k는 HCV 단백질들에 의해 모두 down regulation되었으나, 그 외 다른 protein에 의해서는 영향을 받지 않았다. 이것은 HCV 단백질들은 세포내에서 발현될 때 ER에 존재하게 되는데, 이것에 의한 stress response일 것으로 조심스럽게 사료되어졌다 (Fig. 15).

(4) HCV replicon system에서 PLR2k 발현 양상

HCV의 particle을 현재까지 in vitro에서 만들 수 없기 때문에 HCV infection animal model에서의 POLR2k의 발현 양상을 관찰할 수 없었다. Huh-7 cell에서 replicon system은 이러한 문제점을 조금이나마 해결할 수 있을 것으로 기대하고 본 실험을 실시하였다.

미국 Rockfeller 대학의 CM. Rice로부터 HCV replicon을 가지고 있는 Huh-7 cell을 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포의 특징은 다음과 같다. FL은 HCV full length genome과 neomycin 저항 유전자를 포함하는 pHCVBMFL-neo/S2204I plasmid를 가지고 있으

며, SG는 NS3부터 NS5B까지 비구조 단백질을 포함하며 또한 neomycin 저항 유전자를 포함하는 pHCVrep1bSG-Neo (S2204I) plasmid를 가지고 있는 세포이다. FL과 SG 모두 NS5A 47번째 아미노산이 치환된 adaptive mutation을 가지고 있다. 위 세포들은 모두 10% FBS를 포함하는 DMEM (non essential amino acid, glutamate)에서 37°C, 5% CO₂가 유지되는 조건에서 배양하였다. 100 θ dish에 약 10⁷ cell을 수거하여 total RNA를 분리하고 위와 같은 방법으로 POLR2k에 대한 Northern blot을 실시하였다. 결과 FL과 SG에서 모두 현저히 POLR2k의 발현이 저해 되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 16).



IRF-1 binding sequence: G(A)AAAGTGAAAGT
 Sequence in promoter: AATCAAGAGAAAGG

Fig. 13. IRF-1 stimulates POLR2k promoter activity, but NS5A interferes with activation of POLR2k promoter by IRF-1.

5'300bp plasmid was co-transfected with either 0.1 ug, 1 ug and 5 ug of mIRF-1 expression vector or NS5A into HEK293 cells. At 24 posttransfection, cells were harvested and luciferase activity was determined.

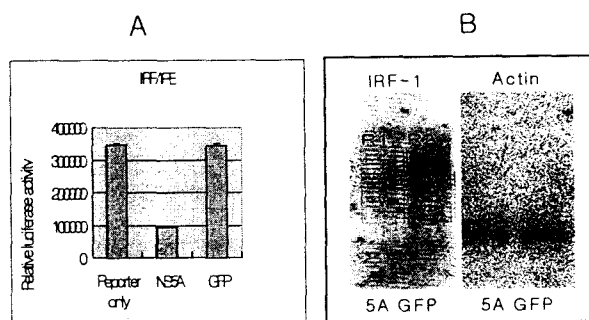


Fig. 14. The NS5A represses IRF-1 gene expression.

A. The reporter plasmid containing interferon-response element (IRE) to which IRF-1 binds was transfected with either NS5A or GFP expression vector into HEK293 cells. At 24 posttransfection, cells were harvested and activity of luciferase was determined. B. Total RNA was isolated from either HEK293 cells transiently expressing NS5A or GFP. Northern blots were performed using ^{32}P -labeled mIRF-1 gene as a probe.

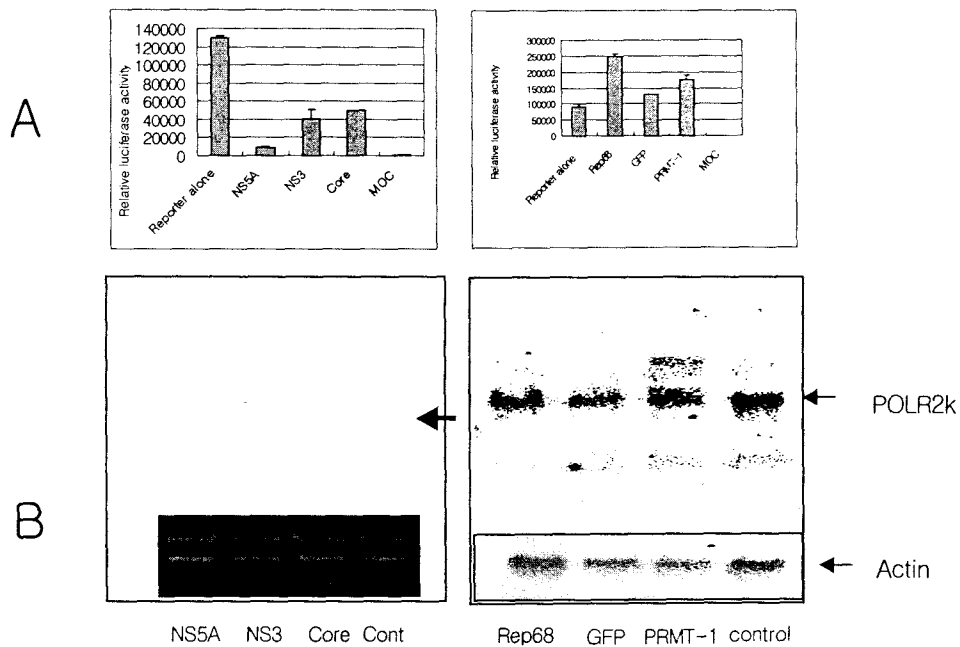


Fig. 15. POLR2K gene expression is modulated by other proteins.

A, HEK293 cells were transfected with POLR2K promoter-luc (Full) and co-transfected with either HCV proteins (NS5A, NS3, core) or other proteins (Rep68, GFP, PRMT1). At 24 hrs posttransfection, cells were harvested. B, 293 cells were transfected as described in A. And then Northern blots were performed using ^{32}P -labeled POLR2k gene as a probe.

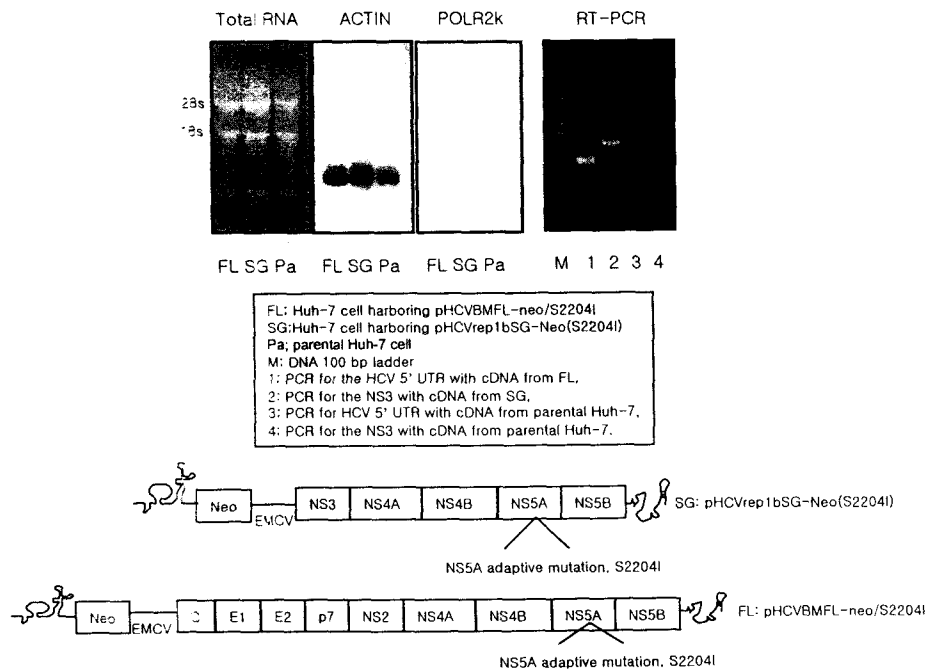


Fig. 16. POLR2k gene expression was repressed in HCV-replicon harboring cells.

FL, Huh-7 cell harboring pHCVBMFL-neo/S2204I, SG, pHCVrep1bSG-Neo(S2204I) and Pa, parental Huh-7 cell. Total RNAs were isolated from each cell line respectively. In order to determine the level of POLR2k transcripts, Northern blot was performed. RT-PCR revealed that FL and SG cells harbored HCV-replicon.

(5) NS5A 발현 세포주의 특성

① 세포성장 속도와 NFkB 활성화 감소

HeLa-NS5A 세포주의 성장속도를 HeLa-Neo 세포주와 비교한 결과 2종 모두에서 세포의 성장률이 감소되어 있음을 발견하였다 (Fig. 17). 이로써 NS5A가 세포성장에 영향을 주고있음을 알 수 있었다. TNF-alpha에 의한 세포사멸에서의 NS5A의 기능을 알아보기 위하여 NS5A 발현 세포주를 TNF-alpha로 처리하고 생존 세포수를 조사한 결과 대조세포주에 비해 큰 차이가 없었으나, NFkB-luciferase를 이용한 reporter assay결과 NS5A 발현세포주에서 TNFalpha에 의한 NFkB활성화가 대조세포주에 비해 2-3배 감소함을 발견하였다 (Fig. 18). 이 경우 NFkB 결합 DNA요소를 이용한 EMSA (electromobility shift assay)결과 NS5A 발현 세포주에서 NFkB활성이 감소되어 있음을 발견하였다. 이 결과로 NS5A유전자가 TNF-alpha 신호전달에 관여하고, 세포의 증식에 관여하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 19).

② Wild type 아데노 바이러스 (WT.Ad)의 복제 저해

NS5A가 발현되는 세포주 HeLa-NS5A에서 POLR2k의 down regulation은 RNA polymerase activity 자체에도 영향을 줄 수 있을 것으로 사료되어 이를 간접적으로 알아볼 수 있는 아데노 바이러스 복제 변화를 NS5A 발현 세포주를 대상으로 확인하였다.

Monolayer로 준비된 HeLa-NS5A 또는 HeLa-Neo 세포주에 0.5 MOI의 WT.Ad를 infection 하고 48시간 후에 crystal violet으로 CPE를 관찰하였다. 또한 세포주의 CAR의 변화를 확인하고자 Ad.GFP 사용하였다. 1MOI의 Ad.GFP를 동일조건으로 준비된 각각의 세포에 감염시키고 24 시간 후 형광현미경으로써 GFP의 발현을 비교함으로써 바이러스의 침투여부를 확인하였다. 결과 NS5A가 발현되는 세포주에서는 WT.Ad에 의한 CPE가 현저히 감소하였음을 알 수 있었다 (Fig. 20). Ad.GFP의 발현 양상은 사용된 세포주에 비슷한 것으로 보아, 바이러스의 침투는 동일하지만, 복제 수준이 낮을 것으로 사료되었다. 또한 WT-Ad의 replication의 감소를 분자적 수준에서 관찰하기 위하여 viral genome 및 VAI(virion associated RNA I), E1A의 발현 차이를 Northern blot으로 확인하였다. Viral genomic DNA는 2 MOI의 WT.Ad를 세포주에 감염시키고 24시간 후에 수거하여 freezing & thawing 법으로 virus를 얻고 PEG 6,000으로 침전시켜 phenol/chloroform으로 추출하였다. 얻어진 DNA는 1% agarose에 전기 영동하여 관찰하였다. 각 세포주에 2MOI의 WT-Ad를 infection 시키고 6시간 후에는 E1A 발현 차이를 위한 total RNA를 분리하였으며, 24 시간 후에는VAI의 발현 차이를 알아보기 위해 total RNA를 분리하여 각각 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP로써 표시된 각각의 probe로 Northern blot 방법으로 관찰하였다. 결과, NS5A의 발현은 viral genomic titer의 감소, VA 및 E1A 유전자 발현의 감소를 유발하는 것으로 나타났다 (Fig. 21).

A

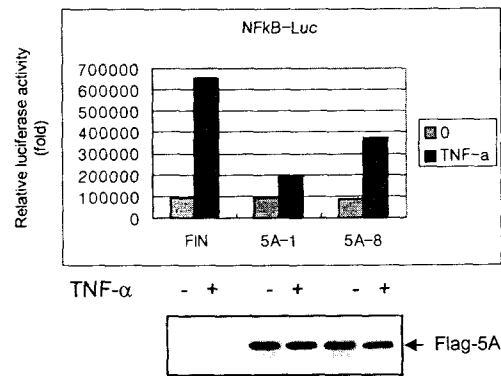


Fig. 17. NS5A inhibits an activation of NFkB induced by the treatment of the cells with TNF-alpha.

NF-kappa B luciferase as a reporter and pCH110 as a control to correct transfected DNA amount were cotransfected into HeLa-NS5A (5A-1 and 5A-2) and parental HeLa cells (FIN). At 24 hrs posttransfection, cells were either untreated or treated with TNF-alpha (10ng/ml) for 6 hrs. And then, reporter activity was measured.

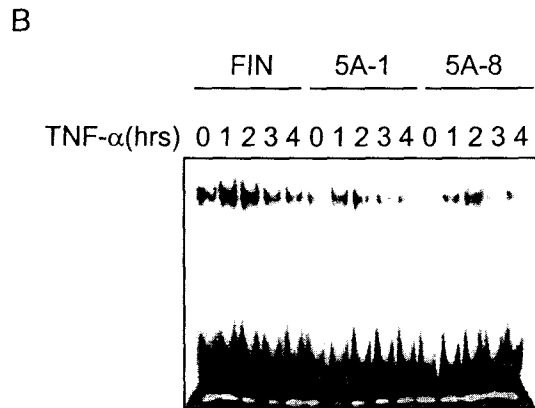


Fig. 18. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing that NS5A inhibits formation of the specific protein-DNA complex comprising of NF κ B protein and an oligomer with NF κ B-binding-consensus nucleotide which was induced by the treatment of the cells with TNF-alpha.

B. Neo control (FIN) or NS5A-expressing (5A-1, 5A-8) cells were treated with TNF-alpha (10 ng/ml). Nuclear extracts were prepared before (0) or after TNF-alpha treatment for the indicated time. EMSA was performed with the nuclear extracts and NF-kappa B binding consensus oligonucleotide labeled with 32 P.

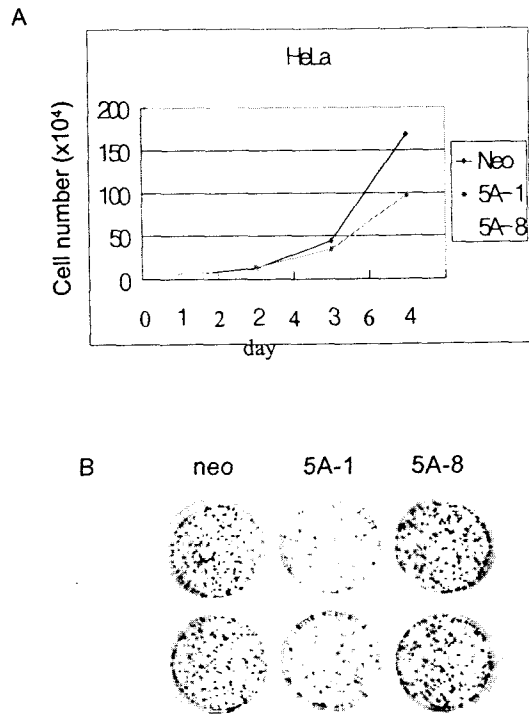


Fig. 19. NS5A inhibits cell growth and colony formation.

A, Cell growth analysis. Neo^r control or NS5A-expressing cells (5A-1, 5A-8) at 5×10^4 were seeded onto 35-mm dishes and grown in medium containing 10% fetal bovine serum at 37°C in CO₂ incubator. The number of survival cells was counted at the day indicated. Each point represents the mean of duplicate dishes. B, Colony formation efficiency assay. Cells of Neo^r control or NS5A-expressing cells (5A-1, 5A-8) at 5×10^2 were seeded onto 60-mm dishes and cultured for 14 days and stained with Coomassie Blue.

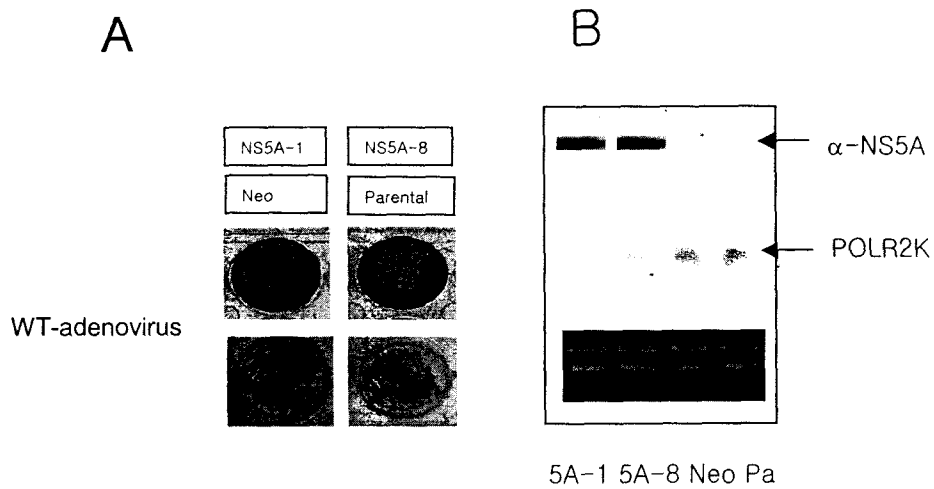


Fig. 20. Replication of wild type adenovirus 5 is inhibited in NS5A expressing cells.

A, 0.5 MOI (multiplicity of infection) of Ad5 was infected to either HeLa-NS5A or HeLa-Neo cells. At 48 hrs postinfection, cells were stained with crystal violet. B, Northern blot analysis was carried out to determine the level of POLR2K transcripts in each cell lines.

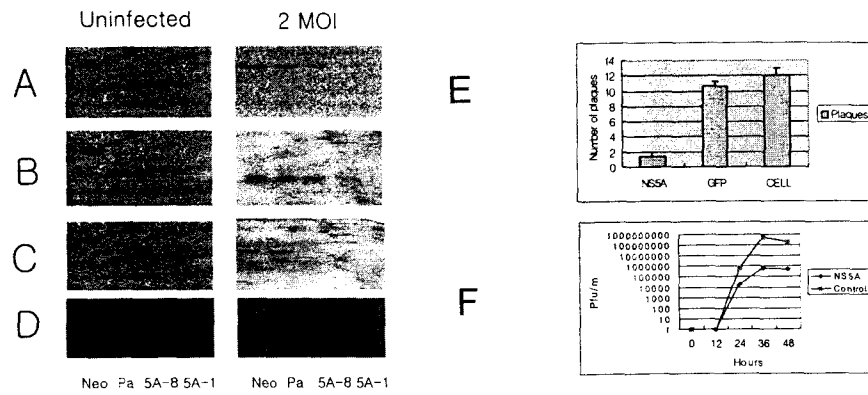


Fig. 21. NS5A inhibits replication of adenovirus genome.

A, Southern blot showing the amounts of adenoviral genomic DNA in HeLa-NS5A and parental cells. B, Northern blot showing the transcript level of virion-associated RNA I of adenovirus at 24 hrs postinfection. C, Northern blot showing the transcript level of the E1A gene of adenovirus at 6 hrs postinfection. D, Northern blot showing the amounts of actin mRNA in the RNA samples. E, The effect of NS5A on the formation of the infectious adenovirus production in 293 cells transiently expressing NS5A. The number of infectious adenovirus was determined by plaque forming assay on 293 cells. F, yield-comparison of infectious adenovirus production in HeLa-NS5A and parental cells

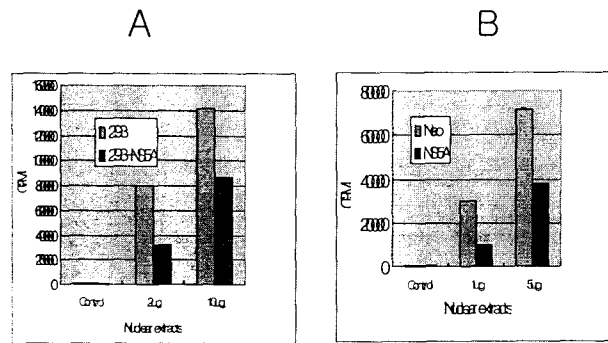


Fig. 22. Promoter-independent transcription activity (Pol II) was decreased in NS5A expressing cell.

Promoter-independent enzyme activity assay was performed using 50 u/ml of poly (dA-dT) as template and quantified by filter binding assay. A, nuclear extracts (NE) were isolated from either NS5A-transfected or GFP-transfected 293 cells and used for nonspecific RNA polymerase assay. B, nuclear extracts (NE) were isolated from HeLa-NS5A and HeLa-Neo and used for RNA polymerase assay.

이러한 변화는 infectious viral particle형성도 감소시킬 것으로 보고 실험을 실시하였다. pCMV-Flag/NS5A 및 UF2-GFP plasmid를 transfection 시킨 HEK293 cell에 직접 0.05MOI의 WT.Ad를 infection하고 gum agar를 overlay 하여 plaque의 형성변화를 관찰하였다. 또 간접적인 방법으로서는 HeLa-NS5A와 HeLa-N대 세포주에 1 MOI 의 WT.Ad를 infection 시키고 각각 12, 24, 36, 48시간 후에 cell을 수거하여 freezing & thawing 방법으로써 viral suspension을 얻었다. 이를 가지고 HEK293 cell에서 다시 plaque assay를 실시하여 PFU의 변화를 확인하였다. 결과, NS5A 발현 세포주에서 WT.Ad의 infectious viral particle형성이 현저히 낮게 나타났다 (Fig. 21).

③ RNA polymerase II 활성 감소

위와 같은 수준의 감소는 세포내의 RNA polymerase 활성변화를 직접적인 방법으로 관찰하고자 promoter independent enzyme activity assay를 실시하였다.

Template로써는 50u/ml의 poly (dA-dT) (Amersham)를 사용하였으며, NS5A가 발현되는 각 세포주로부터 얻어진 nuclear extract와 반응용액 (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.1mg/ml bovine serum albumin, 1mM DTT, 1 unit/ul, 1mMATP, 0.5mMGTP, 0.5mMCTP, 60uM α ³²P-UTP)을 혼합하여 RT에서 2시간 반응 시킨 후, Whatman GF/B paper에 여과하여 건조시키고 radioactivity를 liquid scintillation counter로써 측정하였다. 결과, RNA polymerase II 활성이 NS5A가 발현되는 세포주에서는 약간 감소 되어있었다 (Fig. 22). 이러한 현상은 NS5A가 HCV 감염시에 바이러스에 의한 host shut off 기작에 관여 할 것으로 사료되어졌다.

3. HCV NS3단백질의 세포조절 기능규명

(1) HCV NS3 단백질의 postranslational modification

NS3단백질의 N말단이 세포의 암화를 유도할 수 있다는 보고가 있는 바 NS3 단백질과 결합하는 세포인자 (PRMT5)를 발굴하고 PRMT5가 단백질의 arginine기를 methylation시키는 효소임을 발견하였다. 많은 RNA 결합단백질은 arginine-glycine (RG)repeat를 갖고 있고, 이 RG repeat가 methylation되는 것으로 알려져 있어 PRMT5와 NS3 단백질과의 결합은 RNA 결합단백질의 일종인 NS3단백질이 methylation될 수 있다는 가능성을 제시하였다. NS3단백질의 아미노 산 서열을 조사한 결과 7개의 RG가 존재하였고, 이 중 NS3 helicase IV영역 (QRRGRTGR)에 여러 개의 arginine이 존재함을 발견하였고, 이들이 methylation될 것으로 추정되었다. NS3 helicase IV 영역의 QRRGRTGR motif는 모든 HCV 유전형에 보존되어 있었고, 땡기 바이러스, 일본 뇌염바이러스, 황열병 바이러스 등에서 발견되었다 (Fig 23). HCV의 NS3 단백질이 세포 내에서 메틸화되어 있는지를 Flag epitope으로 표지된 NS3 단백질이 발현되는 293세포를 anti-methylarginine 항체로

면역침전시킨 후 anti-Flag 항체로 immunoblot하거나 anti-Flag 항체로 Flag-NS3단백질이 발현되는 세포를 면역침전시킨 후 anti-methylarginine 항체로 immunoblot하여 NS3단백질이 methylation되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 24). NS3단백질이 세포 내에서 methylation되어 있는 것을 발견한 후 어떤 PRMT가 NS3를 methylation시키는 지와 실제로 NS3 helicase domain IV가 methylation을 되는 지를 조사하였다. 인체 세포주에서 분리정제된 NS3단백질과 대장균에서 발현 분리정제된 NS3 helicase 단백질을 기질로 사용하여 시험관내에서 methyltransferase assay를 수행하였다. Methyltransferase 효소로서는 GST-PRMT1 및 GST-PRMT3를 대장균에서 분리정제하여 사용하였으며, Flag-PRMT5 효소는 293세포주에서 분리정제된 것을 사용하였다. Methyl donor로서는 [¹⁴C]AdoMet을 사용하였다. 반응물들을 SDS-PAGE상에서 분리정제한 후 fluorography하여 반응생성물을 조사하였을 때 GST-PRMT1에 의해서 full-length NS3와 NS3 helicase 영역이 methylation되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 25). PRMT1에 의하여 full-length NS3 단백질과 NS3 helicase 영역이 methylation되고 NS3 protease 영역이 methylation되지 않는다는 것을 대장균에서 분리정제한 maltose-binding protein에 연결된 NS3 protease 영역 단백질 (MBP-NS3)을 methyl acceptor로 사용한 in vitro methyltransferase assay를 통하여 알 수 있었다 (Fig. 25). NS3 단백질이 PRMT1에 methylation되기 때문에 이들 단백질들간에 결합이 시험관내에서 일어나는 지를 조사한 결과 full-length NS3 단백질과 GST-PRMT1과 서로 결합하였으며, GST-PRMT1과 NS3 helicase 영역과의 상호결합이 일어남을 in vitro binding assay를 통하여 알 수 있었다 (Fig. 26). 이 결과들은 NS3단백질은 세포 내에서 methylation되어 있으며, 시험관내에서 PRMT1에 의해 methylation되며, methylation되는 NS3단백질 영역은 pNS3 protease 영역이 아니라, helicase domain이라는 것을 제시하였다. 이는 PRMT1과 NS3 helicase 영역이 시험관내에서 서로 결합한다는 사실에 의해 지지되고 있다. NS3 helicase 영역이 methylation되는 것을 확인한 후 실제로 NS3 helicase 영역에 존재하는 domain IV가 methylation되는 것을 조사하였다. 그림에 제시되어 있는 3종의 domain IV를 포함하는 recombinant GST-융합 단백질을 대장균에서 발현시킨 후 glutathione-agarose beads를 통하여 분리정제하고 in vitro methyltransferase assay를 수행하였다. 그 결과 domain IV를 포함하는 GST-NS3H(1468-1547) 단백질이 methylation되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 27). NS3 helicase domain IV에는 4개의 arginine이 존재하고 이중 어떤 arginine이 methylation되는 지를 알아보기 위하여 domain IV의 arginine을 포함하는 아미노산들이 다른 아미노산으로 치환된 8종의 NS3 helicase point mutant들을 사용하여 in vitro methyltransferase assay를 수행하였다. 그 결과 1493번에 위치한 arginine이 lysine으로 바뀐 R1493K NS3 helicase의 methylation이 일어나지 않았다. 이 결과는 arginine 1493이

주로 methylation되는 arginine이라는 것을 제시하였다. 시험관내 methyltransferase 반응은 매우 비효율적인 효소반응으로 효소 및 기질의 농도에 따라 반응생성물을 검증하는 데에 차이가 날 수 있었다. 비록 NS3 helicase R1493K 단백질의 methylation을 0.1 ug의 PRMT1을 사용하였을 경우 검증할 수 없었지만 PRMT1의 농도를 증가시킬 경우 arginine-1493이외의 다른 arginine이 methylation될 수 있다는 가능성을 배제할 수 없었다. 이를 알아보기 위하여 0.5 및 15 ug의 PRMT1을 사용하여 NS3 helicase R1493K 단백질을 methylation시켰을 때 NS3 helicase R1488L 단백질보다는 낮지만 methylation되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 28). 이 결과는 arginine-1493이외의 다른 arginine이 methylation된다는 것을 의미하였다. Arginine-1493이외의 methylation되는 arginine을 알아보기 위하여 1493-arginine이 leucine으로 치환되고, 동시에 1488-arginine이 leucine으로 치환된 GST-NS3H1458-1547-DM (QLRGRTGTG) 단백질을 대장균에서 분리정제하여 in vitro methyl transferase assay를 수행하였다. 그 결과 GST-NS3H1458-1547-WT은 methylation되는 반면에 GST-NS3H1458-1547-DM 단백질은 methylation되지 않았다 (Fig. 29). 이 결과는 arginine-1493이 주로 methylation되는 아미노산이고, arginine-1488도 methylation될 수 있다는 것을 제시하였다. NS3 RNA helicase는 RNA와 결합하는 단백질로서 domain IV는 RNA와 결합하는 데에 기능할 수 있었다. NS3 helicase의 arginine-1493이 RNA와의 결합에 직접적으로 관여하거나, 직접적으로 결합하지 않더라도 RNA와 상호작용을 통하여 구조의 변화가 일어난다면 arginine의 methylation의 변화가 일어날 것으로 추정되었다. 다양한 농도의 poly(U), poly(A), poly(G), poly(C)를 NS3 helicase 단백질과 반응시킨 후 PRMT1을 이용하여 in vitro methyltransferase assay를 수행하고 반응물을 SDS-PAGE로 분리한 후 fluorography를 하였다. 그 결과 NS3 helicase의 methylation은 정도에 차이는 있었지만 homoribopolymer에 의해 저해받는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 30). 이 결과는 NS3 helicase의 domain IV 특히 arginine-1493이 RNA binding에 직간접적으로 관여하고 있다는 것을 제시하였다.

(2) NS3-PRMT5 상호결합의 생물학적 의미 규명

NS3단백질과 PRMT5가 세포내에서 서로 결합하는 것을 알아보기 위하여 293 세포에 Flag-NS3와 GST-PRMT5를 cotransfection한 후 anti-Flag 항체로 면전시키고, anti-GST 항체로 immunoblot을 하였을 때 GST-PRMT5가 검증되었고, anti-GST 항체로 면역침전시킨 침전물을 anti-Flag 항체로 immunoblot하였을 때 Flag-NS3가 검증되었다 (Fig. 31). 이와 같이 세포 내에서 NS3와 PRMT5가 서로 결합하고 있음을 coimmunoprecipitation 실험으로 확인한 후 NS3와 PRMT5가 세포 내에서 함께 존재하는지를 조사하였다. 이 경우 Flag으로 표지된 full-length NS3 (Flag-NS3), NS3의

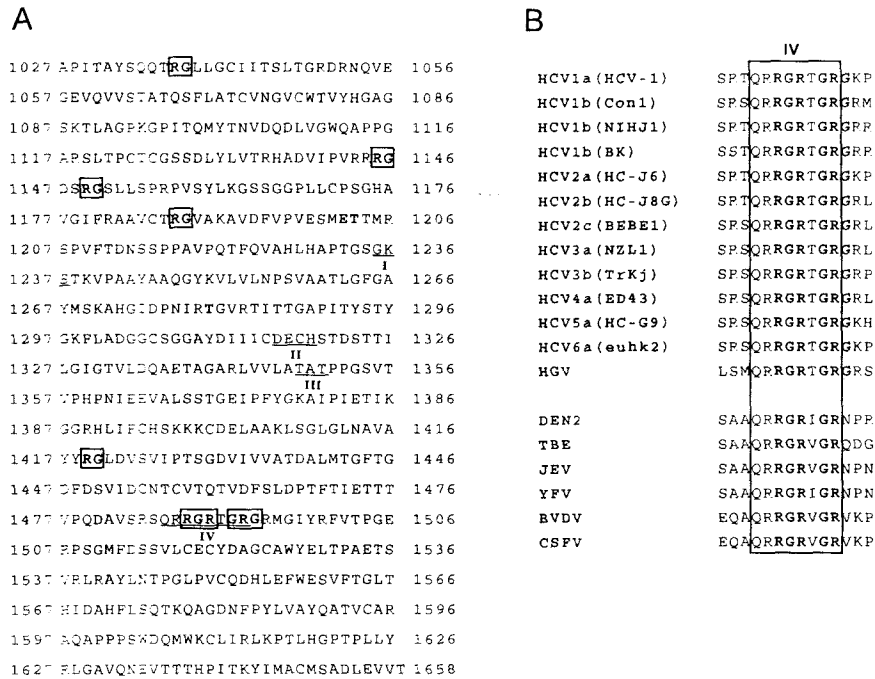


Fig 23. NS3 protein of HCV contains potential arginine methylation sites. (A) Amino acid sequence of NS3 protein of HCV1b. Conserved motifs I, II, III, and IV in the DEAD box family of RNA helicases are underlined. Potential RG motifs in the NS3 protein methylated by PRMTs are boxed and indicated by boldface type. The amino acid sequence of NS3 was obtained from GenBank (accession no. AJ238799). (B) Sequence alignment of motif IV in the RNA helicases of various HCV genotypes and other viruses. Motif IV is boxed. RGR, GRG, and RG motifs are indicated by boldface type. Den-2, dengue type 2 virus; TBE, tick-borne encephalitis virus; JEV, Japanese encephalitis virus; YFV, yellow fever virus; BVDV, bovine diarrhea virus; CSFV, classical swine fever virus.

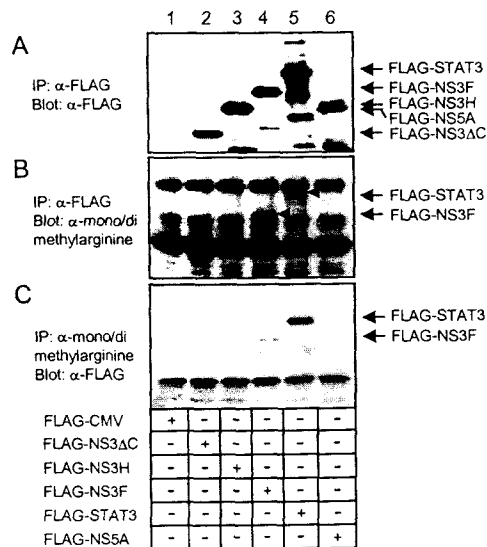


Fig 24. Full-length NS3 protein is arginine-methylated in vivo.

Plasmids harboring full-length NS3 (Flag-NS3F), NS3 helicase domain (Flag-NS3H), NS3 protein with a C-terminal deletion including domain IV (Flag-NS3ΔC), NS5A (Flag-NS5A), and STAT3 (Flag-STAT3) were transfected into 293 cells. The cell lysates were divided into three portions. The portions were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag or anti-mono/dimethylarginine antibodies. The precipitates were analyzed by Western blots with anti-Flag or anti-mono/dimethylarginine antibodies.

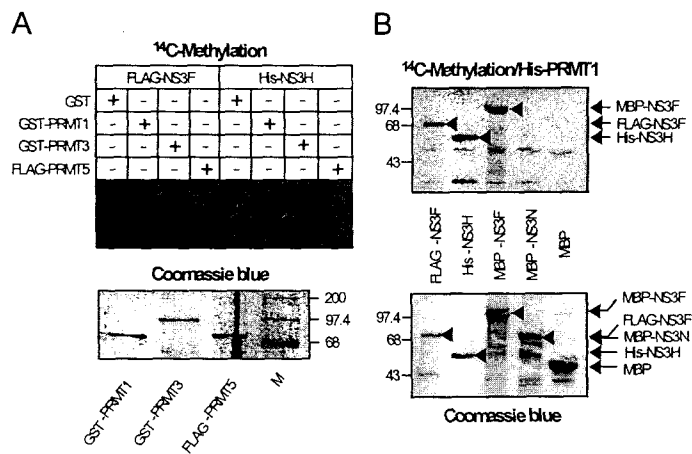


Fig 25. PRMT1 methylates full-length NS3 helicase domain.

(A) PRMT1, but not PRMT5, methylates the NS3 protein. (B) The NS3 helicase domain but not the protease domain is methylated by PRMT1.

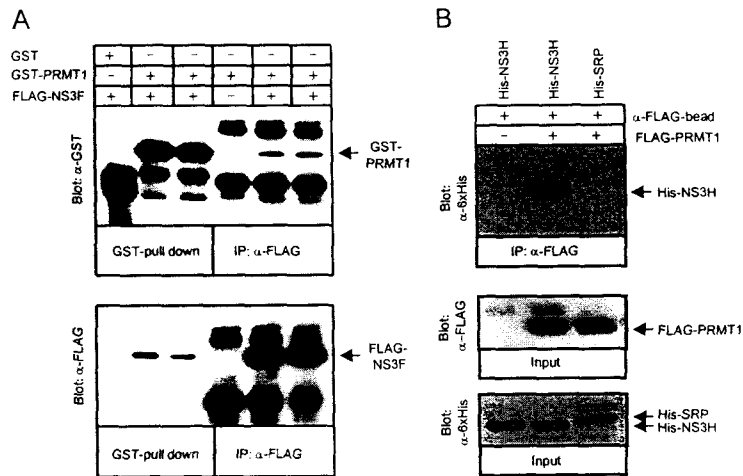


Fig 26. Full-length NS3 RNA helicase domain bind PRMT1 in vitro.

(A) Binding of full-length NS3 protein to PRMT1. (B) The NS3 helicase domain specifically binds Flag-PRMT1.

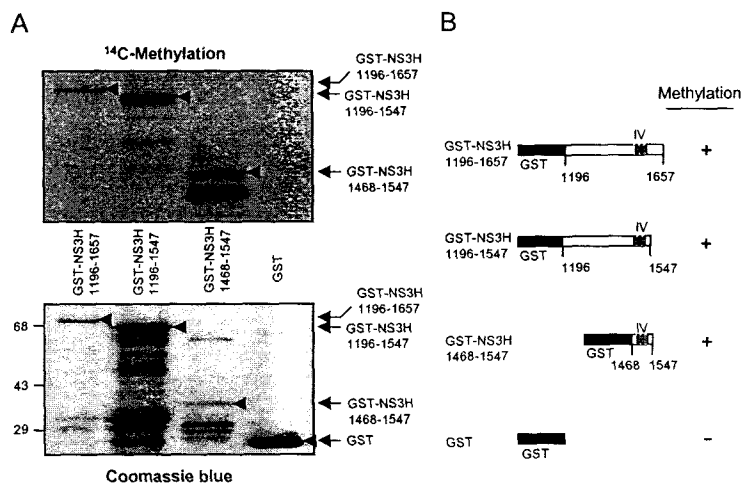


Fig. 27. The QRRGRTGRG motif VI region of NS3 helicase domain is methylated by PRMT1.

(A) The QRRGRTGRG motif VI region is methylated by PRMT1. (B) Schematic illustrations of the NS3 helicase domain deletion mutants.

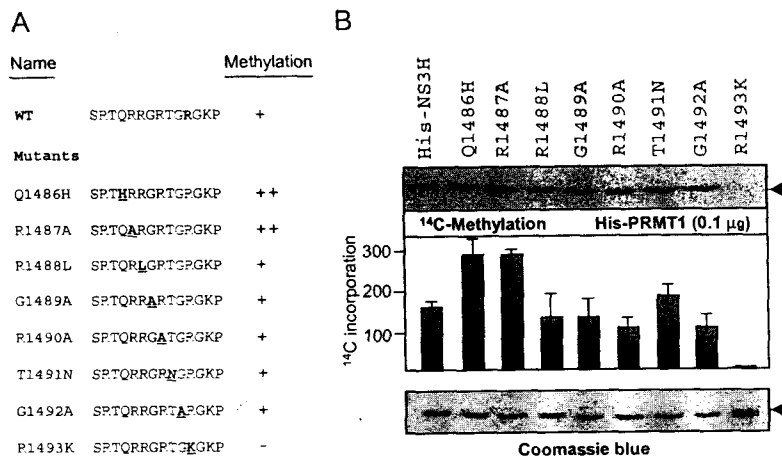


Fig. 28. Arg¹⁴⁹³ residue is essential for the methylation of QRRGRTGRG motif VI.

(A) Amino acid sequence of motif VI with mutations. (B) Arg¹⁴⁹³ residue is essential for NS3 helicase methylation.

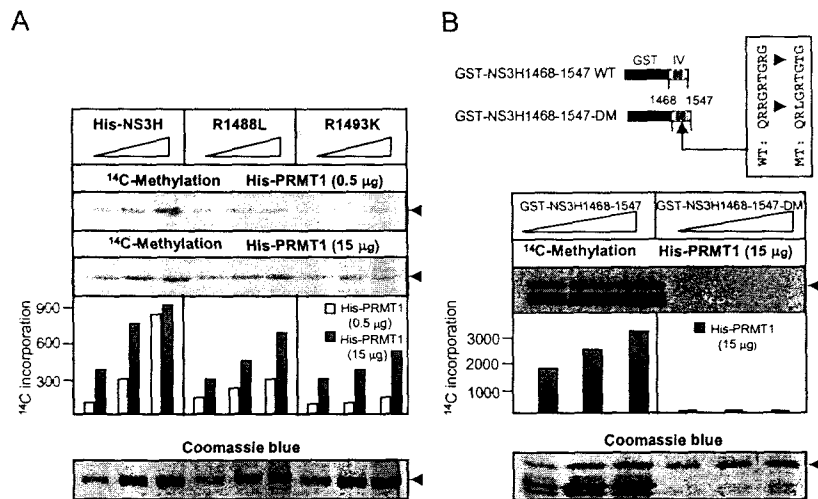


Fig 29. Arg¹⁴⁹³ in motif VI is potentially methylated by PRMT1.

(A) An arginine residue, with the exception of Arg¹⁴⁹³, is methylated. (B) The NS3 mutant containing R1488L and R1493T is not methylated.

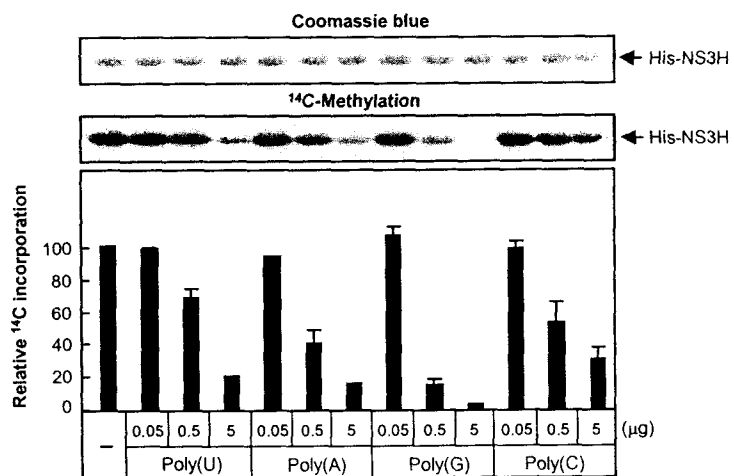


Fig 30. The effect of homoribopolymers on NS3 helicase domain methylation

protease domain (Flag-NS3 Δ C), NS3 helicase domain (Flag-NS3H)을 발현하는 플라스미드를 GFP-PRMT5와 함께 cotransfection한 후 PRMT5의 세포 내 위치는 녹색형광으로, NS3 단백질들의 위치는 anti-Flag항체에 대한 2차 항체에 공유결합된 Rhodamine 형광으로 검증되었다. GFP-PRMT5만 발현되는 경우에 GFP-PRMT5는 세포원형질에 존재하였고, Flag-NS3H 및 Flag-NS3 Δ C의 경우에도 세포 원형질에 존재하였으나, Flag-NS3의 경우에는 세포핵에 존재하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 32). Flag-NS3, Flag-NS3 Δ C, Flag-NS3H 각각을 GFP-PRMT5와 함께 293세포에 cotransfection시킨 후 NS3단백질과 GFP-PRMT5단백질들의 세포 내 위치를 confocal microscopy하에서 조사한 결과 Flag-NS3 및 Flag-NS3 Δ C는 세포내에서 함께 위치하여 존재하였으나, Flag-NS3H는 GFP-PRMT5와 함께 존재하지 않았다. 이 결과는 GFP-PRMT5와 full-length NS3단백질과 서로 결합하고, 결합하는 부위는 NS3 helicase domain이 아닌 protease domain이라는 것을 제시하여 주었다. 이 결과는 또한 NS3 protease domain을 이용하여 효모의 two hybrid을 하였을 때 PRMT5의 C말단과 결합한다는 사실과 일치하였다. Pollack 등은 효모의 two hybrid 실험을 통하여 PRMT5가 Jak kinase들과 서로 결합한다는 사실을 보고하였다. 이 사실에 근거하여 우리는 Jak kinase와 PRMT5 단백질간의 결합이 NS3 단백질에 의해 영향을 받을 수 있을 것으로 가정하였다. 이를 증명하기 위하여 우선 Jak kinase와 PRMT5간의 결합이 세포 내에서 일어나는 지를 검증하였다. Flag epitope으로 표지된 Jak kinase 2와 GST-PRMT5를 293세포주에 cotransfection한 후 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 침전물을 anti-GST 항체로 immunoblot하였을 때 GST-PRMT5가 검증되었고, anti-GST 항체로 면역침전시킨 후 면역침전물을 anti-Flag 항체로 immunoblot하였을 때 Flag-Jak kinase가 검증되었다 (Fig. 33). 이 조건에서 NS3를 함께 발현시켰을 때 과연 Jak kinase와 PRMT5와의 상호결합이 영향을 받는 지를 조사하였다. Jak kinase 2와 GST-PRMT5를 NS3 발현벡터와 함께 293세포에 cotransfection 한 후 anti-GST항체로 면역침전시킨 후 면역침전물을 anti-Flag항체로 immunoblot하여 GST-PRMT5의 존재여부를 조사하였다. NS3 없이 Jak kinase 2와 PRMT5만을 cotransfection,하였을 경우 Jak kinase 2와 PRMT5간의 결합은 관찰되었으나, NS3, Jak kinase 2, PRMT5를 함께 cotransfection하였을 경우 Jak kinase 2와 PRMT5간의 상호결합은 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 34). 이러한 현상은 Jak kinase 1의 경우에도 동일하게 관찰되었다 (Fig. 34). 이 결과는 Jak kinase와 PRMT5간의 결합이 NS3단백질의 농도의존적으로 저해를 받는다는 것을 제시하고 있다. Jak kinase는 일종의 tyrosine kinase로서 세포막에 존재하여 IL-6, 인터페론 알파, 베타, 감마 등과 같은 ligand에 의해 활성화되면 Jak kinase의 tyrosine이 인산화되고 이 때 STAT (signal transducer and activator

of transcription)이 인산화(활성화)된 Jak kinase에 의해 인산화되어 STAT dimer로서 세포 핵으로 이동하여 전사활성화를 촉진한다. 이러한 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달과정은 세포의 증식, 분화, antiviral defence 기전으로서 이해되고 있다. Jak kinase와 PRMT5와 상호작용은 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달과정에 PRMT5가 중간매개자로서 기능할 수 있다는 가능성을 제시하여 주고 있다. 실제로 PRMT 계열의 하나인 PRMT1이 인터페론 알파, 베타 수용체와 물리적으로 결합할 뿐만이 아니라 STAT1과 결합하는 것이 보고되었다. STAT1은 PRMT1에 의해 methylation되고 methylation된 STAT1은 STAT1의 세포내 저해제인 PIAS (protein inhibitor of activated STAT) 단백질과의 결합이 낮아지게 되어 STAT1 methylation은 인터페론 신호전달을 촉진하는 데에 기능을 하는 것으로 보고되었다. 이러한 사실들을 고려하면 PRMT5는 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달과정에 일종의 positive factor로서 작용할 가능성이 높고, 여기에 methyltransferase 활성이 관여되어 있을 가능성이 있었다. 이 가능성을 알아보기 위하여 interferon regulatory factor (IRF-1)의 promoter에 존재하는 interferon response element (IRE)를 갖고있는 reporter gene을 사용하여 인터페론 신호전달계에서의 PRMT5의 역할을 조사하였다. 이 때 PRMT5의 methyltransferase활성이 관여하는 지를 알아보기 위하여 methyltransferase활성이 없는 PRMT5M을 제작하였다. GST-PRMT5와 GST-PRMT5M 발현 벡터를 reporter gene으로 IRE-luciferase과 함께 HepG2 세포에 cotransfection한 후 IL-6, 인터페론 감마로 처리하고 luciferase활성을 조사하였다. GST-PRMT5가 존재할 때 luciferase활성이 IL-6 혹은 인터페론 감마에 의해 2배정도 증가하였고, GST-PRMT5M이 존재하였을 때 luciferase 활성이 4배 이상 감소하였다 (Fig. 35). 이 결과는 PRMT5가 IL-6 혹은 인터페론 감마의 신호전달에 positive factor로 작용한다는 것과, PRMT5의 methyltransferase 활성이 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달과정에 관여되어 있다는 것을 암시하고 있다. NS3 단백질이 인터페론-Jak kinase-STAT 신호전달과정에 관여하는 지를 알아보기 위하여 NS3 발현벡터와 IRE-luciferase reporter gene을 cotransfection하고 인터페론 알파 혹은 감마를 처리하고 luciferase 활성을 조사하였을 때 NS3가 존재하는 경우 luciferase 활성이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 36). 이러한 인터페론 알파 혹은 감마에 의한 IRE-luciferase활성화의 NS3에 의한 감소는 STAT1 혹은 STAT3를 발현시켰을 때 극복되었다. 이 결과는 NS3 단백질이 인터페론 신호전달에서 negative factor로 작용한다는 것을 암시하고 있다.

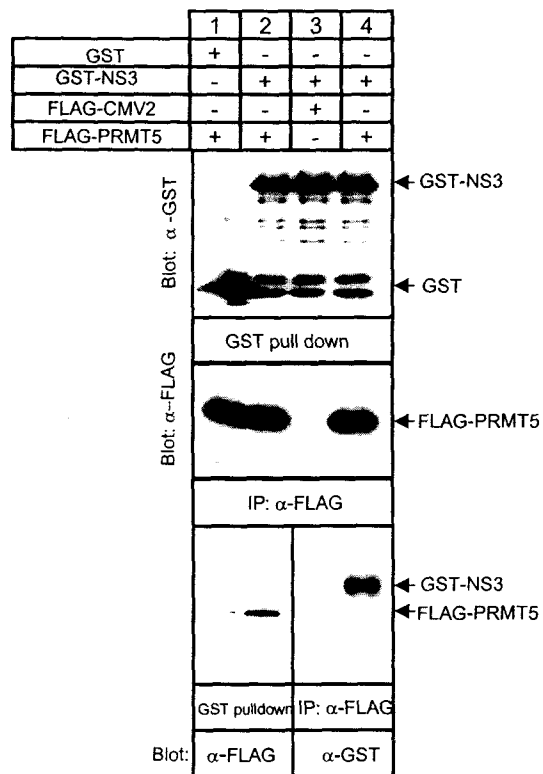


Fig 31. NS3 associates with NS3 in vivo. 293T cells were transfected with GST- or Flag-tagged plasmids.

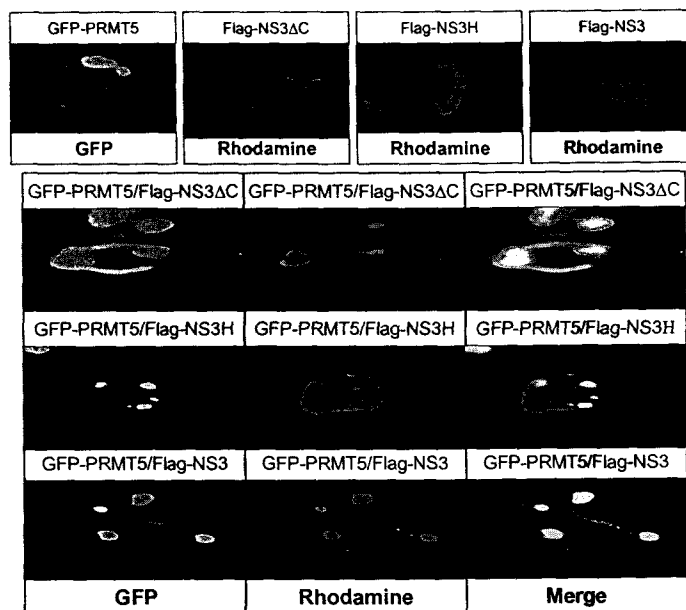


Fig 32. NS3 colocalized with PRMT5 in vivo.

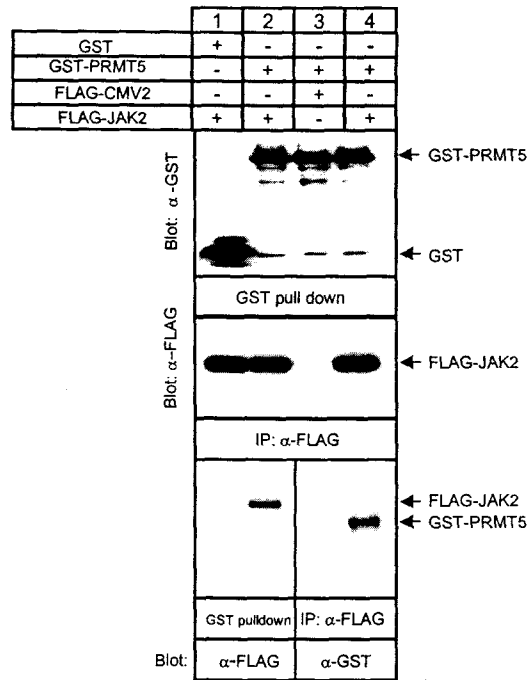


Fig 33. PRMT5 associates with JAK2 *in vivo*

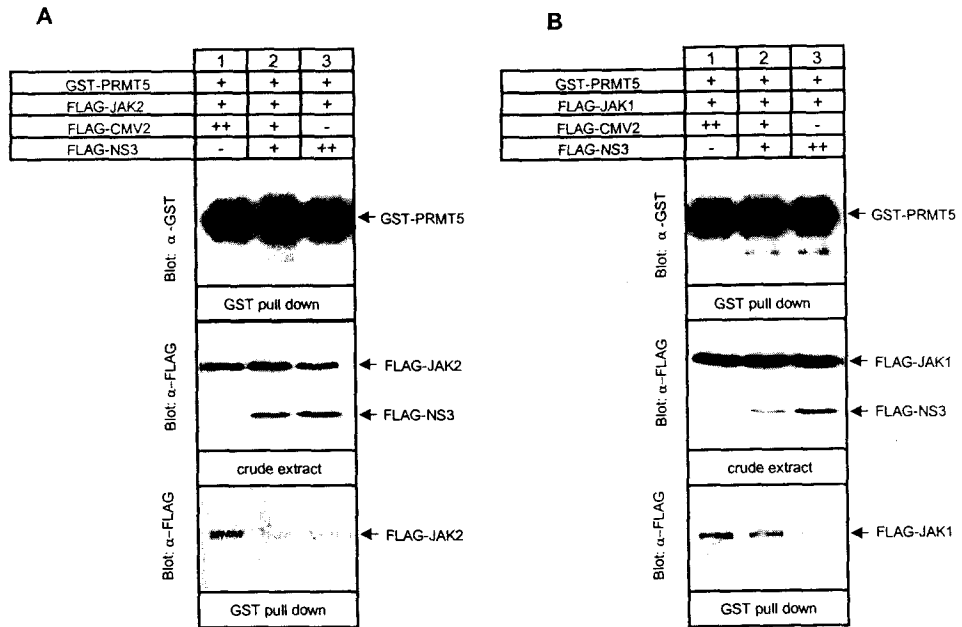


Fig 34. The effect of NS3 on the binding of GST-PRMT5 to JAK kinase in vivo

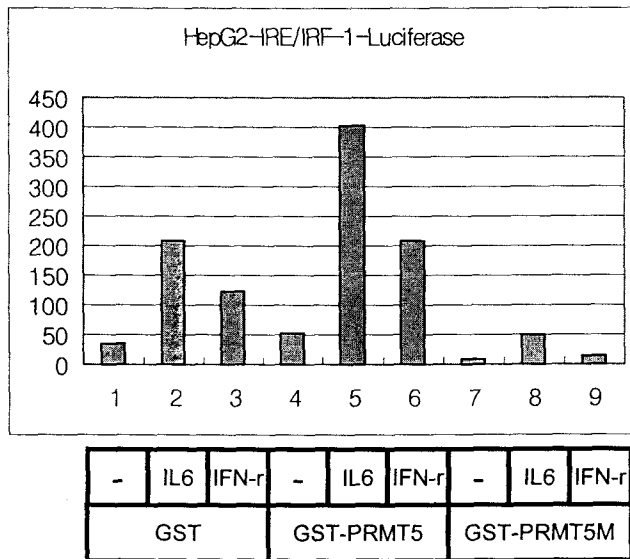
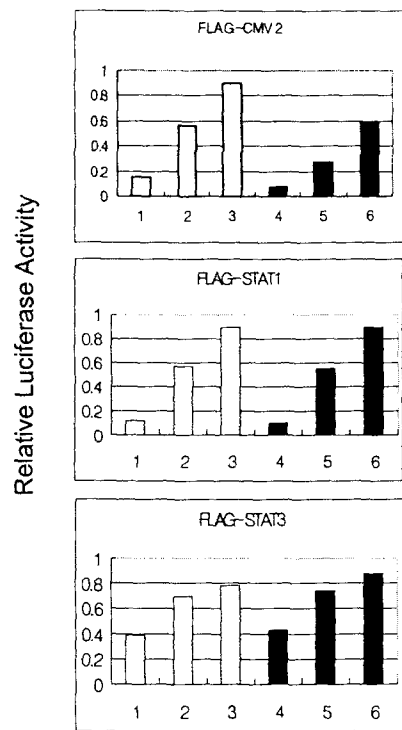


Fig 35. The effect of PRMT5 and PRMT5 mutant on IRF-1-luciferase



Flag-CMV2	+	+	+	-	-	-
Flag-NS3	-	-	-	+	+	+
IFN- α (1000U/ml)	-	+	-	-	+	-
IFN- γ (133U/ml)	-	-	+	-	-	+

Fig 36. Effect of NS3 on STAT1 or STAT3-mediated gene transcription

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4.1. 1차년도 (2001.01.01-2001.06.30)의 목표는 NS5A 및 Core에 의해 조절받는 세포 유전자들을 배양 세포 및 생쥐의 간에서 발굴하기 위하여 transient expression을 강력하게 유도하는 아데노바이러스 유전자 전달체에 NS5A 및 Core유전자를 도입하고, Ad.NS5A 및 Core 벡터를 제작하는 것이었다. 또한 NS5A가 유도적으로 발현되는 발현 벡터 제작 및 이를 이용한 세포주의 제작이었다. 이를 위하여 Ad.NS5A, Ad.core 바이러스들이 제작되었고, 이 바이러스들로 transduction된 세포들에서 NS5A 혹은 core 단백질의 발현을 immunoblot으로 검증하였다. 생쥐의 간조직에 NS5A 및 Core단백질을 전달하기 위한 체계를 확립하기 위하여 Ad.Core, Ad.NS5A, Ad.GFP 바이러스들을 CsCl₂ 용액상에서 초원심분리를 통하여 분리정제하였고, 이들의 타이터를 플라크검증법을 통하여 결정하였다. 이들 바이러스들을 생쥐 꼬리정맥에 주사한 후 간 조직을 적출하고, H&E staining을 통하여 병리학적 이상여부를 알아보았으며, 최적 바이러스 투여용량을 알기 위한 실험을 수행하였다.

Transient expression을 유도하는 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용하여 NS5A에 의해 조절받는 세포 유전자를 발굴하기 위하여 Ad.NS5A 및 Ad.core바이러스들의 타이터를 결정하고 50 MOI의 Ad.NS5A/Ad.GFP, Ad.Core/Ad.GFP 바이러스를 Chang liver cell에 transduction 한 후 NS5A 및 core 단백질의 발현을 확인하였다.

Ad.NS5A, Ad.GFP, Ad.Core바이러스로 각각 transduction 세포의 mRNA를 분리하고, PCR based cDNA subtraction 방법을 이용하여 NS5A나 Core에 의해 up-regulation 혹은 down-regulation되는 세포 유전자들을 발굴할 수 있는 체계를 확립하였다. PCR based cDNA subtraction 방법 외에 cDNA microarray를 이용하여 NS5A나 Core에 의해 up-regulation 혹은 down-regulation되는 세포 유전자들을 발굴하기 위하여 Ad.NS5A/Ad.GFP, Ad.Core/Ad.GFP 바이러스들을 Chang liver cell에 감염후 total RNA를 추출하고, Cy5 및 Cy3로 labeling후 사업단에서 제작한 2.3 k DNA chip을 이용하여 gene expression profiling 수행하고 expression profiling data를 분석하는 체계를 확립하였다. 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용하여 NS5A 및 core유전자에 의해 조절받는 세포 유전자를 발굴하는 체계를 확립함과 동시에 ecdysone에 의해 NS5A가 유도적으로 발현되는 세포주를 제작하기 위하여 pIND/NS5A 벡터를 제작하고 이를 Chang liver cell에 transfection하여 stable transfectant를 제작하였다. 또한 NS5A 단백질이 항상 발현되는 세포주의 제작을 시도하였다.

결론적으로 6개월 간의 1차년도 연구 목표는 계획한 바대로 수행되었고, 아데노바이러스 벡터를 이용한 생쥐의 간으로의 유전자 전달기술, PCR-based subtraction 방법을 이용한 유전자 발굴기술, cDNA microarray를 이용한 유전자 발굴방법 등이 부분적으로 확립되었다.

4.2. 2차년도 (2001.07.01-2002.06.30)의 연구목표는 1차년도에서 확립된 PCR-based subtraction 방법, cDNA microarray 방법과 단백질의 2D 분석을 통하여 HCV NS5A 혹은 Core 단백질에 의해 그 발현이 조절되는 세포인자를 발굴하는 것과 NS3 단백질과 결합하는 PRMT5단백질과의 상호작용의 의미를 규명하는 것이었다.

배양세포이용 NS5A에 의해 조절받는 세포 유전자를 발굴하기 위하여 Ad.NS5A 및 Ad.GFP바이러스로 transduction된 세포의 mRNA를 분리하고 Cy5 및 Cy3로 표지한 다음, cDNA chip 분석을 통하여 NS5A에 의해 그 발현이 억제되는 세포 유전자 1-8U를 발굴하였다. 1-8U 유전자는 인터페론에 의해 그 발현이 조절되는 유전자로서 알려진 바 HCV의 인터페론 내성기전에 관여할 것으로 추정되었다. 또한 2-D gel 분석을 통하여 NS5A에 의해 그 발현이 조절될 수 있는 단백질을 발굴하였다. 유도적인 NS5A 발현세포주는 제작되지 않았으나 NS5A단백질이 항상 발현되는 2종의 헬라세포주 (헬라-NS5A)를 제작하고, 헬라-NS5A 세포주의 특성을 parental HeLa세포주와 비교 분석한 결과 NS5A발현 세포주의 성장속도가 parental cell에 비해 감소하였고, 이들 세포를 TNF-alpha로 처리하고 HeLa-293 세포나 parental HeLa 세포의 생존하는 세포를 헤아렸을 때 의미있는 차이는 발견할 수 없었다. 그러나 reporter gene으로 NFkB-luciferase 함유 플라스미드를 transfection한 후 TNF-alpha로 처리하였을 때 HeLa-NS5A 세포주에서 reporter gene이 parental cell에 비해 의미있게 감소하였고, 이들의 세포 핵 추출물과 NFkB 결합부위를 갖고 있는 oligomer와 반응시킨 다음 EMSA assay를 하였을 때, 특이적인 NFkB-DNA 복합체의 생성량이 HeLa-NS5A의 경우 현저하게 감소하였다. 이 결과는 NS5A에 의해 NFkB의 활성화가 저해된다는 다른 연구자들의 결과와 일치하였다. 또한 이 결과는 HeLa-NS5A세포에서 NS5A가 기능하고 있다는 것을 제시하는 바 이 세포주는 NS5A에 의해 조절받는 세포 유전자 발굴에 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

생쥐 간 조직에서 NS5A 혹은 core에 의해 조절받는 세포 유전자들을 발굴하기 위하여 Ad.NS5A Ad.Core바이러스의 최적 투여용량을 다시 결정하였다. 이는 고용량의 Ad.NS5A, Ad.core, Ad.GFP 바이러스를 생쥐 꼬리 정맥에 주사하였을 때 생쥐가 죽거나, inflammation에 따른 생쥐의 간조직의 손상이 관찰되었기 때문이었다. 생쥐 간 조직에 투여할 수 있는 최적 Ad.NS5A 및 Ad.core 바이러스 용량을 정한 다음 Atlas cDNA microarray를 이용하여 NS5A, Core에 의하여 조절되는 세포 유전자의 발굴을 시도하였다. 우선적으로 Ad.NS5A 바이러스를 생쥐꼬리 정맥에 주사한 후 HCV NS5A 유전자 및 단백질의 생쥐 간조직에서의 발현을 검증하였다. 최적 바이러스 투여용량에서 생쥐 간조직에 특이한 병변현상이 관찰되지 않았다. 다시 NS5A의 발현이 확인되는 Ad.NS5A 바이러스 양을 투여한 후, 생쥐 간조직을 적출한 다음 cDNA microarray 및 2-D gel 분석을 시도하였으나 NS5A에 조절받는 세포 유전자 및 단백질은 발굴되지 않았다. Ad.core를 이용하여 생쥐 간 조직에서 그 발현이 변화되는 세포 유전자의 발굴을 시도하였으나 역시 NS5A의 경우와 마찬가지로 Core에 조절받는 세포 유전자 및 단백

질은 발굴되지 않았다. 아마도 그 이유는 Ad.NS5A 혹은 Ad.core가 생쥐 간 세포에 극히 일부 분만이 전달되거나 NS5A 혹은 core 발현량이 낮음에 기인할 것으로 추정되었다. 그러나, 생쥐 간조직에 유전자를 전달할 수 있는 방법은 확립하였으므로 계획한 목표를 부분적으로 달성하였다. 이 방법은 유전자의 생체 내 기능분석에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

NS3단백질이 PRMT5와 결합한다는 사실에 근거하여 NS3단백질의 세포내 기능을 규명하고자 하였다. NS3단백질이 세포내에서나 시험관 내에서 methylation되는 것을 처음으로 발견하였다. PRMT5와 Jak kinase의 시험관에서 서로 결합한다는 사실이 보고된 바 이들간의 세포 내 결합이 일어나는 것을 coimmunoprecipitation방법으로 확인하였고, Jak kinase와 PRMT5간의 세포 내 결합이 NS3단백질이 존재할 경우에 저해받는 것을 발견하여 이러한 현상이 HCV에 의한 간질환 발생의 원인이 될 수 있음을 밝혔다.

총체적으로 Ad.NS5A, Ad.GFP바이러스 유전자 전달체를 이용하여 NS5A에 의해 그 발현이 억제되는 세포 유전자 1-8U를 발굴하였고, 2-D gel 분석을 통하여 NS5A에 의해 그 발현이 조절될 수 있는 단백질을 발견하여 2차년도 연구목표는 달성되었다. NS5A가 항시 발현되는 2종의 헬라세포주를 제작하였고, NS5A발현 세포주의 특성을 규명하여 계획한 목표를 달성하였다. 또한 NS5A유전자를 생쥐의 간에 전달할 수 있는 기술을 확립하였다. NS3단백질과 결합하는 세포인자의 기능을 분석한 바 단백질의 methylation을 일으키는 활성을 갖는 단백질(PRMT5)이었으며, NS3단백질이 methylation되는 것을 발견하였고, PRMT5와 Jak kinase의 세포 내 결합이 NS3에 의해 저해받는 것을 발견하여 HCV에 의한 간 질환 발생의 원인이 될 수 있는 현상을 밝혔으므로 계획한 목표를 달성하였다.

4.3. 3차년도 (2002.07.01-2003.06.30)에서는 NS5A, Core에 의해 조절받는 세포 유전자를 추가로 발굴하고 그 기능을 규명하며, NS3-PRMT5 상호결합의 생물학적 의미를 규명하고자 하였다.

HCV NS5A에 의해 조절받는 세포유전자를 2-D gel electrophoresis 및 subtractive hybridization방법으로 탐색한 결과 NS5A에 의해 유도되는 세포인자 7종과 억제되는 세포인자 5종을 발굴하고, 세포인자들의 induction 및 repression을 NS5A가 일시적으로 발현되는 조건하에서 검증한 결과 RNA polymerase II polypeptide K (POLR2K; 동물세포의 RNA Pol II subunit중의 하나로서 그 기능은 거의 알려진 바 없음)의 mRNA가 NS5A에 의해 가장 현저하게 억제되는 것을 발견하였다. 이러한 NS5A에 의한 POLR2K mRNA 생성의 억제(repression) 현상이 간암 세포주에서도 관찰되었다. HCV NS5A에 의한 RNA polymerase subunit K (POLR2K) 유전자의 발현억제기전을 규명하기 위하여 POLR2K 유전자의 전사조절부위를 클로닝하였고, 이를 luciferase reporter gene에 연결하여 POLR2K promoter-luciferase reporter gene을 제작하여 transient expression assay를 하였을 때 luciferase활성이 NS5A에 의해 억제

되며 5' 말단 300bp가 전체 promoter activity에 중요하게 작용하고 있다는 것을 알 수 있었다. POLR2K promoter 영역에 IRF-1 (Interferon regulatory factor-1)의 binding site가 존재하는 하고 있다는 정보를 Bioinformatics DB에 근거한 분석으로 얻을 수 있었다. 실제로 POLR2K 유전자의 발현이 인터페론에 의해 증가되고, IRF-1이 POLR2K promoter 영역에 존재하는 IRF-1의 binding site에 결합한다는 사실을 발견하였다. POLR2K의 발현이 NS5A에 의해 저해받는다면 세포내 RNA pol I, II, III의 활성이 저해될 것으로 가정하고, 이를 알아보기 위하여 바이러스 증식에 RNA pol II 및 III의 활성이 필요한 아데노바이러스의 증식정도를 NS5A 발현세포주에서 조사하였다. 2종의 NS5A 발현 세포 주(NS5A-1, NS5A-8)에서 wild type adenovirus의 replication정도를 Southern blot으로 조사한 결과 parental cell에 비해 NS5A 발현 세포주에서 아데노바이러스 유전체의 복제가 감소되었으며, 이는 감염성있는 아데노바이러스의 생성의 저하로 연결되었다. NS5A에 의한 아데노바이러스의 증식저해현상은 POLR2K의 발현 저하에 따른 RNA polymerase (Pol II & Pol III) 활성의 저해일 것으로 가정하고 아데노바이러스의 Pol III 의존성 Virion-associated(VA) RNA 및 Pol II 의존성 E1A 유전자 발현을 HeLa-NS5A 세포 및 parental HeLa세포에서 Northern blot으로 검증한 결과 VA RNA 및 E1A의 mRNA가 HeLa-NS5A세포주에서 감소되어 있는 것을 발견하였다. RNA polymerase II 활성이 HeLa-NS5A 세포에서 parental HeLa세포보다 낮게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 일차적으로 HCV바이러스의 host cell metabolism shutoff 기전으로 이해할 수 있다. 다른 한편으로는 HCV의 host immune escape 전략의 일부로서 HCV의 chronic infection을 효과적으로 유도하는 기전으로 설명될 수 있고 이러한 현상은 간접적인 HCV의 간암유발기전의 일부일 것으로 생각해 볼 수 있다.

HCV core에 의해 조절받는 세포유전자를 Ad.core 및 Ad.GFP로 transduction된 세포단백질의 2-D gel electrophoresis 및 세포 RNA의 PCR-based subtractive hybridization 방법으로 탐색한 결과 core에 의해 발현이 유도되는 세포인자 7종과 억제되는 세포인자 8종을 일차적으로 발굴하였고, 이 중 RT-PCR 및 Northern blot analysis을 통하여 HCV core에 의해 induction되는 세포인자는 RAS-GRF2, KIAA1254, TSG101인 것으로 밝혀졌다. TSG101, KIAA1254, Ras-GRF2 단백질이 Core에 의해 발현이 증가되는 것을 Ad.Core 바이러스를 이용하여 Chang liver cell 에서 Northern blot을 통하여 관찰하였다. 동일한 조건에서 Huh7 과 HepG2 cell 에서 위 단백질의 변화를 RT-PCR로써 확인하였을 때 TSG101과 KIAA1254 단백질은 모두 발현이 증가되어 있었으나, Ras-GRF2는 RT-PCR에서 예상 product 가 나타나지 않았다. Northern blot으로 TSG101변화를 확인하였을 때 Huh7 과 HepG2 cell에서 이들의 transcript가 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. TSG101는 정상세포의 tumorigenesis에 관련한다는 보고가 있으며, KIAA1254는 cell proliferation에 관련하는 것으로 보고되어 있지만 현재까지 이 유전자들의 기능이 정확히 알려진바 없다. Core에 의해 상기 유전자들의 발현이 촉진되는 것은

core가 liver cell의 carcinogenesis에 관련이 있을 것으로 가정할 수 있을 것이다. 이를 검증하기 위해서 본 유전자의 발현 백터를 제작하여 transformation assay등을 실시하고 함께 promoter analysis도 진행할 계획이다. 이러한 연구는 HCV에 의한 간암유발기전규명에 기여할 것으로 보인다.

HCV NS3 단백질이 PRMT5와 물리적으로 결합하고 있음을 본 연구팀이 밝혔고 PRMT5가 Jak kinase가 상호 결합하고 있음이 보고되었다. 이러한 NS3-PRMT5-Jak kinase 상호작용으로 인하여 HCV NS3단백질이 인터페론-Jak-Stat 신호전달에 영향을 줄 것으로 추정되었고, 이 현상은 HCV의 chronic infection 유도 및 간암 발생과 연관되어 있을 수 있었다. 이를 알아보기 위하여 Jak2를 세포 내에 과량 발현시켰을 때 일어나는 Jak kinase의 autophosphorylation에 NS3단백질이 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 NS3단백질이 Jak kinase의 autophosphorylation을 저해하였고 Jak kinase의 활성화에 따른 IRE/IRF-1 promoter의 활성화가 감소되는 것을 관찰하였다. 이 결과는 NS3가 Jak-STAT 신호전달과정에 간섭한다는 것을 의미하고 이 간섭현상의 mediator는 PRMT5일 수 있다는 것을 제시하여 주었다. 이 현상은 HCV의 chronic infection 유도 및 간암 발생과 연관되어 있을 것으로 보인다.

결론적으로 3차년도에서 HCV NS5A에 의해 조절받는 12종의 후보 세포유전자를 발굴하고, 이 중 RNA polymerase II subunit중의 하나인 POLR2K의 발현이 NS5A에 의해 가장 현저하게 억제되는 기전을 규명하여, HCV바이러스의 host cell metabolism shutoff 기전 혹은 HCV의 host immune escape 전략의 일부로서 HCV의 chronic infection을 효과적으로 유도하는 기전일 수 있음을 제시하였다. HCV core에 의해 조절받는 15종의 세포유전자를 일차적으로 발굴하였고, 이 중 RT-PCR 및 Northern blot analysis을 통하여 HCV core에 의해 induction되는 세포인자는 RAS-GRF2, KIAA1254, TSG101인 것으로 밝혀졌다. 이들 유전자의 기능은 세포의 증식과 관련되어 있으므로 Core에 의한 간세포 암화과정을 부분적으로 설명할 수 있을 것으로 보인다. HCV NS3-PRMT5-Jak kinase 상호작용으로 인하여 HCV NS3단백질이 인터페론-Jak-Stat 신호전달에 영향을 줄 것으로 추정되었고, 이를 실험적으로 일부 증명하였다. 따라서 전체적으로 계획한 연구목표를 달성하였고 3차 년도에 얻은 연구결과들을 HCV에 의한 암의 진행과정을 분자세포수준에서 설명하는 데에 기여할 수 있을 것으로 여겨진다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

HCV로 감염된 환자의 60-80%가 만성 간염으로 진행되고 만성 간염환자중에 20%가 간경변증을 동반하는 간세포암으로 진행된다. HCV 감염 후 간암이 발생할 때까지는 10-20년 이상이 걸리는 것으로 알려져 있다. 이러한 장기간에 걸친 바이러스와 간세포와의 끊임없는 상호작용을 통하여 HCV는 숙주세포에서 생존하기 위한 다양한 전략을 구사하고 숙주는 면역체계를 비롯한 다양한 방어시스템을 작동시켜 간세포의 정상적인 기능을 손상시키는 HCV를 제거하려 한다. 이 과정이 결국 염증이라는 현상으로 나타나고, 염증에 따른 간 세포의 파괴 및 재생이 빈번하게 일어나게 되며, 결국 이 과정에서 간 세포의 유전적 변이를 통한 정상적인 통제를 벗어난 변이 세포가 출현하게 되고 이러한 변이된 간 세포가 간 경변증을 거쳐 간 세포암으로 진행되는 것으로 이해되고 있다. 이러한 간 세포암 발생과정은 HCV가 간세포 변이를 유도하는 데에 다양한 기전이 존재할 것으로 예측하게 한다. 이러한 과정을 이해하기 위하여 본 연구는 수행되었다. 본 연구에서 HCV NS5A에 의해 조절받는 수종의 세포유전자를 발굴하고 이중 특히 동물세포의 RNA Pol II subunit중의 하나인 POLR2K 유전자의 발현이 NS5A에 의해 가장 현저하게 억제되는 것을 발견하였다. HCV NS5A에 의한 RNA polymerase subunit K (POLR2K) 유전자의 발현억제기전을 규명한 결과 POLR2K promoter 영역에 존재하고 있는 IRF-1 binding site가 주된 역할을 하고 있는 것을 발견하였다. 실제로 POLR2K 유전자의 발현은 인터페론에 의해 유도되었다. 이 결과는 HCV가 감염된 세포에서 효과적으로 증식하기 위하여 숙주세포의 대사를 저해하거나 차단하는 기전의 하나로서 그 의미를 이해할 수 있다. 다른 한편으로는 HCV의 숙주방어체계를 회피하는 전략의 일부로서 HCV의 chronic infection을 효과적으로 유도하는 기전으로 설명될 수 있다. 이러한 현상은 간접적인 HCV의 간암유발 기전의 일부일 것으로 생각해 볼 수 있다. 이를 입증하기 위한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다. 숙주 RNA polymerase의 중요한 subunit중의 하나인 POLR2K가 인터페론에 의해 조절받을 수 있다는 사실은 숙주의 유전자 발현조절에 핵심이 되는 RNA polymerase의 조절기전 규명에 기여할 수 있을 것으로 보인다.

HCV core에 의해 induction되는 세포인자는 RAS-GRF2, KIAA1254, TSG101인 것으로 일차적으로 밝혀졌다. TSG101는 정상세포의 tumorigenesis에 관련한다는 보고가 있으며, KIAA1254는 cell proliferation에 관련하는 것으로 보고되어 있지만 현재까지 이 유전자들의 기능이 정확히 알려진바 없다. RAS-GRF2을 과발현시켰을 때 세포의 암화현상이 일어나는 것으로 알려져 있다. Core에 의해 상기 유전자들의 발현이 촉진되는 것은 core가 liver cell의 carcinogenesis에 관련이 있을 것으로 가정할 수 있을 것이다. 이를 검증하기 위해서 본 유전자의 발현 벡터를 제작하여 transformation assay등을 실시하고 이와 함께 promoter analysis도 진행할 수 있다면 HCV에 의한 간암유발기전규명에 기여할 것으로 보인다. 이러한 연구를 간암발생과정을

이해하고 간암 치료제 개발에 유용한 소재가 될 수 있을 것으로 사료된다.

HCV NS3 단백질이 PRMT5와 물리적으로 결합하고 있고, PRMT5 methyltransferase활성이 인터페론 신호전달에 positive factor로 작용하고 있음을 본 연구팀이 밝혔고 PRMT5가 Jak kinase가 상호 결합하고 있음이 보고되었다. 이러한 NS3-PRMT5-Jak kinase 상호작용으로 인하여 HCV NS3단백질이 인터페론-Jak-Stat 신호전달에 영향을 줄 것으로 추정되었고, 이 현상은 HCV의 chronic infection 유도 및 간암 발생과 연관되어 있을 수 있다. 이 과정에 PRMT5의 methyltransferase활성이 어떻게 관여되어 있는 지는 향후 해결하여야 할 중요한 문제로 남아있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

간세포암은 전세계적으로 다섯 번째의 발생 빈도수를 갖는 치명적인 질병으로 인지되고 있으며 2000년도에만 약 54만명이 간세포암으로 사망하였다. 간암은 아시아 및 아프리카 지역에서 많이 발생하고 있으며, 최근 연구결과는 미국, 일본, 유럽제국 등에서 간암환자수가 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다. 간암의 유발인자는 간염바이러스, 알콜, 아플라톡신 등이 알려져 있으나 분자세포수준에서의 간암발생의 원인은 아직도 규명되지 않고 있다. 지금까지 알려진 간암의 원인인자들로서는 p53, Rb, beat-catenin 등의 mutation, 과다하게 발현된 c-myc, cyclin D1 등이 있다. LOH (loss of heterozygosity)는 암억제유전자의 불활성화와 관련되어 있을 수 있는 데, 간세포암에서 염색체 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16q, 및 17p 위치에서 LOH가 빈번하게 일어나고 있다. 그러나 이러한 단편적인 간암관련 지식들은 여전히 서로 완벽하게 연결되지 않고 있기 때문에, 간 세포암은 다양한 기전을 통하여 발생하는 것으로 추정되고 있다. 이러한 상황에서 최근에 개발된 유전체수준에서의 대규모 유전자 발현양상 분석기술 (gene expression profiling)은 보다 연결고리가 있는 간암발생과정을 이해하는 데에 이용되고 있다. 간암 관련 유전자를 발굴하기 위하여 Differential Display (DD), SSH, (suppression subtractive hybridization), PCR-based subtractive hybridization, RDA (representational difference analysis) 방법등이 사용되었으나, 이 방법들은 정량적이지 않으며, 노동 집약적이므로, 이를 극복하기 위하여 SAGE (serial analysis of gene expression)방법이 개발되었다. 보다 효과적으로 간암관련 유전자들을 대규모로 발굴하기 위한 수단으로 cDNA microarray기법이 개발되었고, 이보다 특이성이 향상된 oligonucleotide를 이용한 array기법이 개발되어 많은 연구들에 의해 사용되고 있다. 이러한 microarray기법으로 matrix metalloprotease 14 (MMP14), osteonectin (SPARC) 유전자들이 간세포암에서 과발현되어 있는 것이 밝혀졌다. MMP14는 basement membrane과 stromal extracellular matrix을 분해하는 기능을 수행하여 암침습에 중요한 역할을 수행하며, osteonectin은 일종의 당단백질로서 세포의 matrix를 재구성하는 데에 그 기능을 수행한다. RhoB(ARHB)는 간암에서 그 발현이 낮았으며, Ras 발암유전자 계열의 RhoA(ARHA)의 발현은 간암에서 증가되어 있었다. 이 결과들은 Ras/Erk 및 Ras/RhoA 신호전달계가 정상 간세포에서 cytokine에 의해 유도되는 NOS2의 발현을 억제하는 반면에, RhoB는 NOS2의 발현을 촉진시킨다는 결과와 일치하였다. 이 결과는 Ras 및 RhoA와 같은 세포암화유도 유전자들이 NOS2의 발현을 저해하는 반면, RhoB와 같은 암억제유전자들은 NOS2의 발현을 촉진시킨다는 최초의 증거이었다. Dynein은 분자모터로서 microtubule을 따라 움직이는 단백질인데, dynein light chain 1 (PIN, ddle1)의 발현이 간암 및 HCV 및 HBV로 감염된 만성 간염의 경우에 증가되어 있었다. Dynein은 세포사멸을 억제하는 작용을 갖는 것이 초파리에서 밝혀졌다. 또한 Dynein은 NFkB의존적 유전자 발현조절에 관여되어 있음이 밝혀졌다. 따라서, dynein은 간세포암의 형태뿐만이 아니라 세포사멸억제작용을 통하여 암발생에 관여되어 있을 가능성이 제시되었다. Decorin은 간암에서 그 발현이 낮은 것으로 밝혀졌는데, Decorin은 TGF beta에 결합하여 그 기능을 저해하는 것으로 알려져 간경변증을 경유하는 간암의 진행을 저해하는 세포인자일 수 있

음이 제시되었다. DLC1 (deleted liver cancer 1) 유전자는 간암에서 제거되어 있는 것으로 밝혀졌고, DLC1 유전자를 대장암에 과발현시켰을 때, 암화가 억제되는 것으로 보아 간암발생의 negative factor로서 기능할 것으로 추정되고 있다.

Microarray기법을 이용한 암 관련 유전자 발굴을 통하여 간암발생에 관여하는 유전자들이 다수 발굴되고 있고 부분적으로 그들의 기능이 분석되어 간암발생과의 연결성이 서서히 규명되고 있으나, 여전히 간암 발생에 key player들은 아직도 정확히 알려지고 있다. 따라서 간암을 혈액중에서 조기에 발견할 수 있는 특이적이고 감지도가 탁월한 표지유전자 혹은 단백질을 발굴하는 것이 중요할 것으로 보인다. 또한 간암의 heterogeneity를 감안하더라도 간암 발생에 중요한 기능을 수행하는 분자표적의 발굴이 간암 치료제 개발에 결정적일 것으로 보인다. 국외연구는 이러한 문제를 해결하기 위한 방향에서 진행되고 있는 것처럼 보인다.

제 7 장 참고문헌

1. Aoki H, J Hayashi, M Moriyama, Y Arakawa, and O Hino. 2000. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase raf-1. *J Virol* 74, 1736-1741.
2. Jin DY, HLWang, Y Zhou, ACS Chun, KV Kivler, YD Hou, HF Kung, and KT Jeang. 2000. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 19, 729-740.
3. Moriya K, H Fujie, Y Shintani, H Yotsuyanagi, T Tsutsumi, K Ishibashi, Y Matsuura, S Kimura, T Miyamura, K Koike. 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4, 1065-1067.
4. Sakamuro D, Furukawa T, and T Takegami. 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms MIH3T3 cells. *J Virol* 69, 3893-3896.
5. Kato N, KH Lan, SK Ono-nita, Y Shiratori, and M Omata. 1997. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 71, 8856-8859.
6. Gale M Jr, CM Blakely, B Kwieciszewski, SL Tan, M Dossett, NM Tang, MJ Korth, SJ Polyak, DR Gretch, and MG Katze. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18, 5208-5218.
7. Gale M Jr, B Kwieciszewski, M Dossett, H Nakao, and MG Katze. 1999. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR kinase. *J Virol* 73, 6506-6516.
8. Taylor DR, ST Shi, PR Romano, GN Barber, MMC Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *science* 285, 107-110.
9. Park JS, JM Yang, MK Min. 2000. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Comm* 267, 581-587.
10. Chang YE, and LA Laimins. 2000. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type31. *J Virol* 74, 4174-4182.
11. Nobuyuki Arima, Chien-Yuan Kao, Thomas Licht, Raji Padmanabhan, Yausyuki sasaguri, R. Padmanabhan. 2001. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem*. 276, 12675-12684.
12. Kuitada shimonoto. 2000. Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Cancer biology*. 10,

233-240.

13. Jill Pfughber, Brenda Fredericksen, Rhea Sumper. Jr, Chunfu Wang, Felecia Ware, Donald L. Sodora, Micheal Gale Jr. 2002. Regulation of PKR an IRF-1 during hepatitis C virus replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 4650-4655.

14. Brain P.Schlegel, Victoria J. Green, John A A. Ldias, Jeffrey.D. Parvin. 2000. BRCA1 interaction with RNA polymerase II reveals a role for hRPB2 and hRPB 10 α in activated transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 3148-3153.

제 2 부

간암유발 바이러스 단백질군과 상호결합하는 숙주 세포단백질군의 체계적인 발굴 및 기능연구

주관연구기관 : 한국생명공학연구원

연구책임자 : 허 광 래

연구원 : 정 경 숙
원 미 선
유 승 우

제 1 장 연구개발과제의 개요

간암 발생에 관여하는 바이러스인 HCV가 숙주세포에 침투 할 때, 숙주세포의 정상적 세포신호전달 체계를 교란된다고 알려져 있다. 어떤 숙주세포 단백질이 이들 바이러스 단백질과 상호 작용하여, 정상적 세포신호전달 체계를 교란하는가를 규명하고자한다. 특히 이 신호전달체계의 교란이 실제 간암유발과 관계있는가를 규명하기 위한 세포주 수준에서의 연구를 통해, 장차 동물모델에서의 바이러스에 의한 간암발생기작을 설명하는데 기여하고자한다. 특히 HCV의 단백질중의 하나인 NS5A의 간암 유발 역할규명에 1차 연구목표를 두고 있다.

HCV의 pathogenicity 에 관여하리라 사료되는 HCV의 단백질인 NS5A와 상호 결합하는 숙주 세포 내의 새로운 단백질을 발굴하고, 그 기능을 연구하여 HCV의 치료제 target이 될 수 있는지 여부를 판단하는 발판을 마련한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지의 NS5A에 대한 국내외의 많은 연구는 NS5A와 Core가 다양한 숙주세포의 단백질과 결합한다는 사실에 중점을 두고 있다. 최근 보고된 HCV NS5A와 상호 결합하는 숙주세포 단백질군의 연구내용은 기존의 상호작용 단백질 외에 다른 종류의 단백질이 HCV NS5A와 상호 결합하리라는 추정을 가능케 한다.

현재까지 NS5A의 기능에 대해 보고된 연구 현황은 다음과 같다. Katze group은 vaccinia-based assay system을 이용하여 HCV NS5A의 세포 내 기능을 보고하였다. 이 보고에 의하면 NS5A를 vaccinia vector를 통해 HeLa S3세포에서 발현시키면, 먼저 PKR (Interferon-induced Protein Kinase R)의 인산화 및 활성화를 억제하고(He and Katze, 2002), 그 다음으로 PKR에 의한 eIF2의 Ser51 인산화를 방해되어서, 최종적으로 인터페론의 작용에 중요한 세포 내 단백질합성이 억제된다고 보고하였다. 즉 PKR → p38 (stress-activated protein kinase) → MnK1 → eIF4E라는 cap-dependent translation pathway가 NS5A에 의해 교란됨을 보여주었다. 이는 HCV가 infection되었을 때, 숙주세포의 cap-dependent translation pathway를 NS5A로 교란시켜 HCV mRNA에 유리한 cap-independent translation환경을 만들어 주는 것으로 보고하였다 (He *et al.*, 2001). 이 과정은 앞서 언급한 Grb2를 통한 MAP kinase pathway와는 다른 또 하나의 HCV의 병리적 기작으로 받아들여지고 있다. David Gretch group은 NS5A에 의한 인터페론의 항 바이러스 효과를 감소시키는 원인이 상기의 PKR인산화 억제 외에도, NS5A에 의한 Interleukin-8 (IL-8)의 전사 증가라고 생각하고 있다 (Polyak *et al.*, 2001).

Lai group과 한국의 한림대 및 이화여대의공동연구결과에 의하면, NS5A가 TNF--induced signaling의 일부로 기여 들면서 그 signaling의 일부인 NF- κ B의 활성화를 방해한다고 보고 하였다 (Park *et al.*, 2002). Lai group은 이전에도 yeast two-hybrid 방법에 의하여, NS5A가 HCV의 RNA polymerase (NS5B)와 결합하면서 SNARE-like 단백질 [이 논문에 의하면, hVAP-33 (human vesicle-associated membrane protein of 33 kDa)]과도 결합하여 complex를 구성한다고 보고한바 있다. 이런 사실은 NS5A가 NS5B와 함께 membrane의 replication complex와 결합함으로써 HCV의 replication에 상당히 많은 관여를 하고 있음을 알 수 있다. 또한, Lai group은 HCV에 의한 간암 발병 시 간조직에 지방이 축적되는 steatosis 현상의 원인을 규명하기도 하였다. Yeast two-hybrid의 결과에 의하면, NS5A는 Core와 기름방울에 colocalize하면서 HDL의 지질 단백질인 ApoA1와도 결합할 수 있다 (Shi *et al.*, 2002). 국내의 연구 분야를 살펴보면, 포항공대 장승기 교수팀이 그 기능은 잘 알 수 없지만, NS5A는 세포내의 RNA 수송에 관여하는 karyopherin 3와 결합함을 보고하였다(Chung *et al.*, 2000).

아마도 이점은 NS5A가 HCV의 replication에 관여할 수도 있다는 점을 시사한다. NS5A와 Core가 상호 결합 한다는 사실은 다른 여러 연구 그룹에 의하여도 이미 보고된 바 있다. NS5A는 HCV의 RNA polymerase (NS5B) 이외에도 Core와도 결합하고 (yeast two-hybrid로 발견), Core에 의하여 proteolytic cleavage를 당한다고 보고된 바 있다(Goh *et al.*, 2001).

NS5A와 결합한다고 보고가 된 Core 역시 NS5A가 결합하는 것으로 알려져 있는 많은 숙주 세포의 단백질과 결합을 하며 그 기능도 다양하다고 알려져 있다. 대표적으로 Core와 결합하는 숙주세포 단백질은 다음과 같다. ; TNFR (Zhu *et al.*, 1998), Lymphotoxin receptor (Matsumoto *et al.*, 1997), RNA helicases (Mamiya and Worman, 1999), heterogenous ribonucleoprotein K (Hsieh *et al.*, 1998), p53 (Lu *et al.*, 1999), LZIP (Jin *et al.*, 2000). 그러나 Core는 주로 숙주세포의 세포질에 존재하므로, 전사조절의 활성화에 관여하기 위하여서는 그 작용기전이 NS5A와 마찬가지로 간접적이어야 한다. 따라서 NS5A와 Core가 상호 결합 한다는 사실은 Core의 경우와 마찬가지로 상당히 많은 수의 숙주 단백질이 NS5A와 직/간접적으로 관여되어있다는 점을 시사한다. NS5A의 세포성장효과는 NS5A중의 일부가 전사촉진부분 (transcriptional activation domain)이라는 사실에서 기인한다. 하지만 일본의 Omata group에 의하면 이런 전사촉진 기능은 아미노 말단에 존재하는 약 146 아미노산으로 이루어진 전사촉진 억제기능에 의하여 그 기능이 감추어져 있다 (Kato *et al.*, 1997).

모든 연구 그룹들이 NS5A의 세포성장효과를 언급하지는 않는다. 최근 Padmanabhan 그룹에 의하면, NS5A는 세포주기 조절에서 S phase는 줄이고 G2/M phase는 늘려서 세포성장을 저해한다고 보고하였다 (Arima *et al.*, 2001). Ray group은 NS5A는 p53과 직접적으로 결합하여, p21/waf1 유전자 level을 down-regulation 시킴으로써 세포성장효과를 보여준다고 보고하였다 (Majumder *et al.*, 2001). p53과 p21/waf1는 현재 세포주기 및 세포 내 다양한 신호 전달계를 통제하는 중요한 요소로 연구되어 왔다. NS5A가 이런 key factors들과 상호 결합함은 NS5A가 간암유발 기작에서 중추적 역할을 할 수 있다는 추론을 가능케 하고 있다. Ray group은 또한 yeast two-hybrid 실험으로, NS5A가 전사 활성화에 관여하는 CREB binding protein인 CBP와 같이 전사의 coactivator로 작용하는 SRCAP (SNF-2 related CBP activator protein; sir CAP으로 발음)과도 결합한다고 보고하였다. 그리고 mammalian two-hybrid assay와 *in vitro* binding assay를 통해 NS5A가 SRCAP과 물리적으로 결합함을 밝혔다 (Girard *et al.*, 2002). 이런 현상을 통해 HCV NS5A가 virus-mediated pathogenesis를 유발하리라 추정하고 있다. Katze group의 연구에 의하여 HeLa cell에서 mitogenic signaling에 관여하는 Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) adaptor protein의 N-말단의 SH3 지역과 NS5A의 C-말단에 존재하는 proline-rich 지역의 2개의 SH3-binding 지역이 상호 결합한다는 사실이 알려졌다 (Tan *et al.*, 1999). 이것은 NS5A 기능 중의 하나가 ERK1/2 신호 전달계를 교란함으로써 세포 신호 전달계의 중추인 mitogenic signaling을 방

해할 수도 있다는 점에서 시사하는 바가 크다. 이 보고서는 NS5A가 세포 내 MAP kinase pathway에 관여하는 최초의 보고서이다. 이런 보고에 이어서, Harris M 그룹에 의해서 NS5A가 Ras-ERK신호전달을 방해함으로써 activating protein1 (AP-1)의 활성을 억제한다는 보고가 있다 (Macdonald *et al.*, 2003). 이런 보고들은 NS5A에 의한 신호전달계의 혼란이 hepatocacinoma의 직, 간접적인 원인이 될 수도 있음을 암시한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

3.1 실험 방법

3.1.1. Yeast two-hybrid screening

3.1.1.1. Construction of bait plasmids

Yeast two-hybrid의 bait plasmid 제작을 위한 parents plasmid로 pHybLex/Zeo를 사용하였다. NS5A 유전자의 full-length(약 1.3kb)는 HCV의 cDNA를 template로 사용하고, 제한효소 SalI extension을 갖는 Table 1A와 같이 제작된 NS5A(Full) Forward와 Reverse primer로 실행한 polymerase chain reaction(PCR)을 통하여 증폭한 후 pGEM-T easy vector에 cloning 하여 pGEM-T-NS5A-F (full-length)를 제작한 후 제한효소 SalI로 잘라 SalI-SalI NS5A-F fragment (1.3 kb)를 얻은 다음, 제한 효소 SalI으로 절단된 pHybLex/Zeo plasmid에 삽입하여 pHybLex/Zeo-NS5A-F을 제작하였다 (Figure 1). 그리고 NS5A내에 putative transcriptional activation domain과 cleavage site가 존재하므로 4종류의 NS5A-domain, 즉 NS5A1~150aa, NS5A1~300aa, NS5A300~447aa, 그리고 NS5A150~447aa 로 나누고 각각 NS5A-a, NS5A-b, NS5A-c 그리고 NS5A-d 라 명명하였다 (Figure 1). 이들 domain들도 NS5A-F과 같은 방법으로 pHybLex/Zeo에 cloning 하였다. 각 domain의 유전자는 pHybLex/Zeo-NS5A-F을 template로 사용하고 Table 3B와 같이 제작된 primer를 Table 1C와 같은 조합으로 PCR을 실행하여 증폭하였으며, forward primer의 5' 말단에는 제한효소 NotI extension을 갖고 있으며 reverse primer의 5' 말단에는 제한효소 SalI extension을 갖는다 (Table 1B).

각 NS5A domain의 PCR 산물들을 pGEM-T easy vector에 cloning한 후, 제한효소 NotI과 SalI로 절단된 pHybLex/Zeo에 삽입하여 pHybLex/Zeo-NS5A-a, -b, -c 그리고 -d를 제작하였고, pHybLex/Zeo-NS5A-F와 함께 yeast two-hybrid에서 bait plasmid로 사용하였다 (Figure 1). Yeast two-hybrid의 prey plasmid는 pYESTrp2의 EcoRI과 XhoI site에 cloning되어 있는 human liver cDNA library를 구입하여 사용하였다. Bait plasmid와 prey plasmid는 yeast two-hybrid screening을 위해 cesium chloride-ethidium bromide gradient method를 이용하여 대량 분리하였다.

3.1.1.2. Yeast two-hybrid

Yeast two-hybrid system은 recombinant DNA technology를 이용하여 DNA-binding domain (DBD)과 activation domain (AD)을 물리적으로 분리한 뒤, 하나의 host cell내에서 별도로 발현시키는 방법이다. 만약 상호 결합이 가능한 두 단백질의 유전자를 각각 DNA binding domain 또는 activation domain을 갖는 plasmid와 재조합한 뒤, 숙주 효모에 도입해 발현시키면 두 단백질의 상호작용에 의해 DNA binding domain과 activation domain이 함께 전사를 촉진할 수 있게 된다. 기존의 GAL4 system다음으로 개발된 LexA system은 *E. coli*

DH5 의 SOS gene의 repressor 기능을 하는 LexA 단백질을 DNA-binding domain으로 이용하고, 숙주 효모에서 전사기능을 할 수 있는 *E. coli* DH5 의 B42 단백질을 activation domain으로 이용한다. 이 system의 경우, reporter gene으로서 *lacZ* 를 사용하고, 그 upstream에는 LexA operator가 존재하고 효모의 inducible GAL1 promoter를 사용하여 galactose에 의해 activation domain의 fusion 단백질의 발현이 조절 받을 수 있게 되어 있는데, 이는 외래 단백질이 효모 세포 내에서 toxic하게 작용 할 수 있는 가능성을 줄이는 장점이 있다. 또한 *lacZ* reporter gene이 효모세포의 genome에 one copy로 존재하는 것이 아니라 high copy로 존재하여 X-gal이 포함된 배지에서 β -galactosidase activity를 쉽게 확인할 수 있는 장점도 있으므로 Lex system (Invitrogen사)을 이용하였다. Large scale yeast two-hybrid screening을 수행하기에 앞서 각 bait의 self-activation 여부를 확인하고자 filter-lift β -galactosidase assay를 실시하였다. 이런 과정을 거쳐 self-activation 작용이 없는 pHybLex/Zeo-NS5A-F, -a, -b 그리고 -c의 bait plasmid를 가지고 대량의 yeast two-hybrid screening을 수행하였다. *S. cerevisiae* L40의 single colony 2~3 개를 YPDA 250 ml에 접종하여 30°C 에서 overnight 배양한 후, YPDA 500 ml에 O.D600가 0.2~0.3이 되도록 접종한 뒤, OD600 가 0.5~0.6이 될 때까지 30°C 에서 200rpm으로 진탕배양하였다. OD600가 0.5~0.6인 *S. cerevisiae* L40을 상온에서 3,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 cell pellet을 얻었으며, 250 ml의 멸균수로 washing한 후 1X TE/LiAc 4 ml를 첨가하여 *S. cerevisiae* L40 competent cell을 준비하였다. 이렇게 준비된 competent cell에 DNA-BD/Bait인 pHybLex/Zeo-NS5A, -a, -b, -c 또는 -d plasmid 500 g, pYESTrp2-human liver cancer cDNA library plasmid 500 g 그리고 denatured salmon sperm carrier DNA (10 mg/ml) 을 첨가한 후 TE/LiAc/40% PEG3350 solution 30 ml를 첨가하여 30°C에서 30분 동안 200rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 3.5 ml을 첨가하였으며, 42°C에서 15분 동안 반응시킨 후, 얼음에서 1~2분 동안 식힌 다음 3,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 1X TE 5 ml을 첨가하여 resuspending한 후 각각 15장의 SD/-Ura -Trp -His /Zeo plate에 spreading하였고, 30°C에서 5~7일 동안 배양하였다. β -galactosidase plate assay와 filter-lift β -galactosidase assay를 실시하여 blue positive clone을 확인하였다. 상기의 plate에서 자라는 cotransformants을 SD/-Trp/-His/-Ura agar plate 와 SD/-Trp/-His/-Ura//X-gal agar plate 에 동시에 같은 위치에 patch하여 30°C 에서 1~2일 동안 배양하고 X-gal plate 에서 선택된 colony 들의 색깔 변화를 관찰하였으며, Whatmann filter paper로 SD/-Trp/-His/-Ura/agarplate의 cotransformants를 뜯 뒤 액체 질소에 약 30초 동안 담겨 cell을 썬 후, X-gal/Z buffer solution 이 담겨 있는 petri dish에 띄운 다음, 30°C incubator에서 반응시켜 색깔 변화를 관찰하여 blue positive colony를 선택하였다 (Figure 3).

3.1.2. Isolation and confirmation of blue positive colonies

3.1.2.1. Isolation of plasmid from positive *S. cerevisiae* candidate clones

Blue positive colony들을 SD/-Trp/-His/-Ura/agar plate로부터 멸균된 이쑤시개로 획득하여 YPAD/Zeo 액체 배지 2 ml에 접종하여 30°C에서 overnight 진탕배양한 후, 3,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 이 pellet에 yeast lysis buffer 400 μ l를 첨가하여 pellet을 resuspending한 후, phenol : chloroform (1:1) 400 μ l와 glass-bead 약 0.3g정도첨가한 다음 3~4분 동안 vortexing하였다. 4°C, 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상등액을 새 tube로 옮기고, 상등액의 1/10과 2배에 해당하는 3 M NaOAc (pH 5.0)와 99.9% EtOH을 첨가한 뒤 혼합하였고, -70°C에서 2시간동안 plasmid를 침전 시켰다. 그런 다음, 4°C에서 12,000rpm으로 20동안 원심분리하여 plasmid pellet을 얻었고, 이 pellet을 70% EtOH로 2회 washing한 후 멸균된 3차 증류수로 plasmid pellet을 녹여 분리하였다.

3.1.2.2. Transformation of the plasmids into *E. coli* DH5 α

DH5 α competent cell 50 μ l에 각 blue positive cotransformants로부터 분리해 낸 plasmids를 첨가한 후, electrophoration 시켰다. 위 cell에 SOC 액체배지 1 ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 regeneration 시킨 다음, LB/Ampicillin (50 μ g/ml) plate에 spreading 하였고, 37°C 에서 overnight 배양하였다.

3.1.2.3. Isolation of the plasmids from *E. coli* DH5 α transformants

위의 각 *E. coli* transformant들로부터 plasmid extraction kit (BIONEER 사)를 이용하여 cDNA library plasmid를 분리하였다. 먼저 LB/Ampicillin plate 에서 생성된 *E. coli* transformant를 LB/Amp 2 ml에 접종하여 37°C에서 overnight 진탕배양한 후 8,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell pellet을 얻었다. 이 pellet에 resuspension solution 250 μ l을 첨가하여 cell pellet을 resuspending한 다음, lysis solution 250 μ l을 첨가하여 부드럽게 혼합하였고, 여기에 다시 neutralization solution 350 μ l를 첨가한 뒤 부드럽게 혼합한 후, 4°C, 12,000rpm에서 10동안 원심분리하였다. 상등액을 DNA binding 용 column에 투입하여 원심분리하고 80% EtOH 700 μ l을 column에 투입 시켜 2회 washing한 후 elution buffer 50 μ l를 loading 하였다. 이 column을 원심분리하여 plasmid를 분리했으며 제한 효소EcoRI과 XhoI으로 잘라 insert, 즉 cDNA 존재유무를 확인하였다.

3.1.2.4. Analysis of cDNA sequence

확인된 insert를 sequencing (KRIBB)하여 한 뒤 NCBI (National Center for Biotechnology Information) network service의 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이

용하여 frame이 맞는지 확인한 후, frame이 맞는 cDNA들에 대한 유전정보를 얻었다. 또한 NCBI의 conserved domain search program을 이용하여 각 유전자 내에 있는 여러 가지 domain을 분석하였다.

3.1.3. *In vitro* binding

3.1.3.1. Construction of GST/NS5A fusion protein

GST/NS5A-F (pGEX4T-2/NS5A-F)는 pHybLex/Zeo-NS5A-F plasmid를 제작한 방법과 같은 방식으로 제작되었다. pHybLex/Zeo-NS5A-F plasmid를 제한 효소 SalI로 절단하여 NS5A-F fragment (1.3 kb, SalI-SalI fragment)를 얻었고, pGEX-4T-2 plasmid도 제한 효소 SalI로 절단하였다. SalI-SalI NS5A-F fragment를 SalI로 절단된 pGEX-4T-2의 SalI site에 frame에 맞추어 삽입하여 pGEX4T-2/NS5A-F를 제작하였다 (Figure 4),

3.1.3.2. Construction of MBP/positive clones fusion proteins

Yeast two-hybrid를 통해 발굴한 NS5A-c와 상호 결합하는 단백질군 중 c14, c18, c39, c45, c78의 cDNA full sequence에 대한 primer를 Table 4와 같이 제작하였다. 각 clone의 full-length는 cDNA library를 template로 사용하고, Table 4의 primer를 사용하여 실행한 PCR을 통하여 증폭하였으며 각 forward primer 5' 말단에는 제한효소 EcoRI extension을 갖고 있으며, reverse primer 5' 말단에는 제한효소 BamHI extension을 갖는다 (Table 2). 먼저 pGEM-T easy vector에 cloning한 후, 제한 효소 EcoRI과 BamHI으로 자르고, 역시 제한 효소 EcoRI과 BamHI으로 절단된 pMAL-cri에 삽입하여 pMAL/c14, c18, c39, c45, 그리고 c78을 제작하였다 (Figure 5).

3.1.3.3. Expression and purification of the fusion proteins

NS5A-c와 상호 결합하는 단백질 중 c14, c18, c39, c45 그리고 c78이 생체 외 (*in vitro*)에서 직접 또는 간접적으로 상호 결합하는지를 확인하기 위해 GST pull-down assay (Figure 10)와 MBP pull-down assay를 방법을 이용하였다. GST/NS5A F fusion protein과 MBP/c14, c18, c39, c45, 그리고 c78을 얻기 위해 pGEX4T-2/NS5A plasmid와 pMAL-cri/c14, c18, c39, c45 그리고 c78 plasmids를 *E. coli* DH5a에 형질전환하여 transformant를 얻었다. 이 transformant를 LB/Amp 액체 배지 15 ml에 접종하여 37°C에서 overnight 진탕배양하였다. 이 overnight culture를 적당량의 LB/Amp 액체 배지에 O.D600=0.2 가 되도록 접종하여 O.D600= 0.4~0.5가 될 때 까지 37°C에서 진탕배양하였다. O.D600 = 0.4~0.5의 cell culture에 IPTG (isopropyl 1-D-thiogalactopyranoside, 1 mM)을 첨가한 후, 37°C에서 5시간 동안 진탕배양하여 over-expression을 유도하였다. Overexpression된 cell culture를 4°C에서 5,000rpm으로 10분

동안 원심분리하여 cell pellet을 얻은 다음, -70℃에 보관하였다. 이 cell culture 중 1 ml은 1.5 ml microtube에 담아 원심분리하여 cell pellet을 얻은 다음, 1X PBS buffer 200 μ l로 resuspending 하여 cell을 lysis시키기 위하여 sonication 하였다. Sonication된 cell을 4℃에서 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 새 1.5 ml microtube로 옮겼다. 이 sample에 5X SDS sample buffer 40 μ l를 첨가한 뒤 99℃에서 10분 동안 heating 한 후, 상온에서 식혔다. 이 sample을 4℃에서 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액 중 일부를 10% SDS-PAGE gel을 통해 protein expression 여부를 확인하였다 (Figure 8). control로 pGEX4T-1과 pMAL plasmid도 같은 조건으로 expression시켰다.

Expression된 protein의 양을 확인한 다음, -70℃에 보관되어있던 cell을 적당량 꺼내 얼음에서 녹였다. 각 cell에 *E.coli* lysis buffer 를 첨가하여 sonication한 다음, 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 여러 번 원심분리하여 깨끗한 상등액을 획득하였다.

3.1.3.4. *In vitro* binding

상기 clone들(c14, c18, c39, c45, 그리고 c78)이 NS5A-F과 직접적으로 결합하는지를 알아보기 위해 GST pull-down (Figure 6) 과 MBP pull-down 을 이용하여 *in vitro* binding assay를 실행하였다. Sonication된 GST 또는 GST/NS5A-F 상등액과 MBP 또는 MBP/c14, c18, c39, c45, 그리고 c78 의 상등액의 혼합액에 GSH sepharose bead 또는 amylose resin을 각각 첨가하여 4℃에서 overnight binding 시켰다. 이렇게 incubation된 용액을 1% Triton X-100과 0.5% NP-40 (in 1X PBS buffer)로 3~ 4회 washing 한 후, 10% SDS-PAGE 을 통해 전기영동하였다.

3.5. Confirmation of binding by western blot analysis

SDS-PAGE gel을 통해 전기영동을 한 gel을 PDVF membrane (Millipore)에 transfer한 후, 이 filter를 blocking buffer (5% Skim milk)에서 2시간 이상 blocking 반응시켰다. 그런 다음 primary antibody와 secondary antibody로 차례대로 1시간 동안 반응시킨 후, PDVF membrane washing buffer로 3회 washing 하였다. 그 후, 발색시약 (ECL kit)을 사용하여 film 에 노출시키고 현상하였다. GST pull-down을 이용한 *in vitro* binding을 확인할 경우, GST 및 GST/NS5A-F는 rabbit polyclonal anti-GST (1:2,000)와 anti-rabbit Ig (1:5,000)으로 검출하였고, MBP 및 MBP/c14, c18, c39, c45, 그리고 c78는 mouse anti-MBP altose binding protein) (1:2,000)와 anti-mouse Ig (1:5,000)로 검출하였다 (Figure 10).

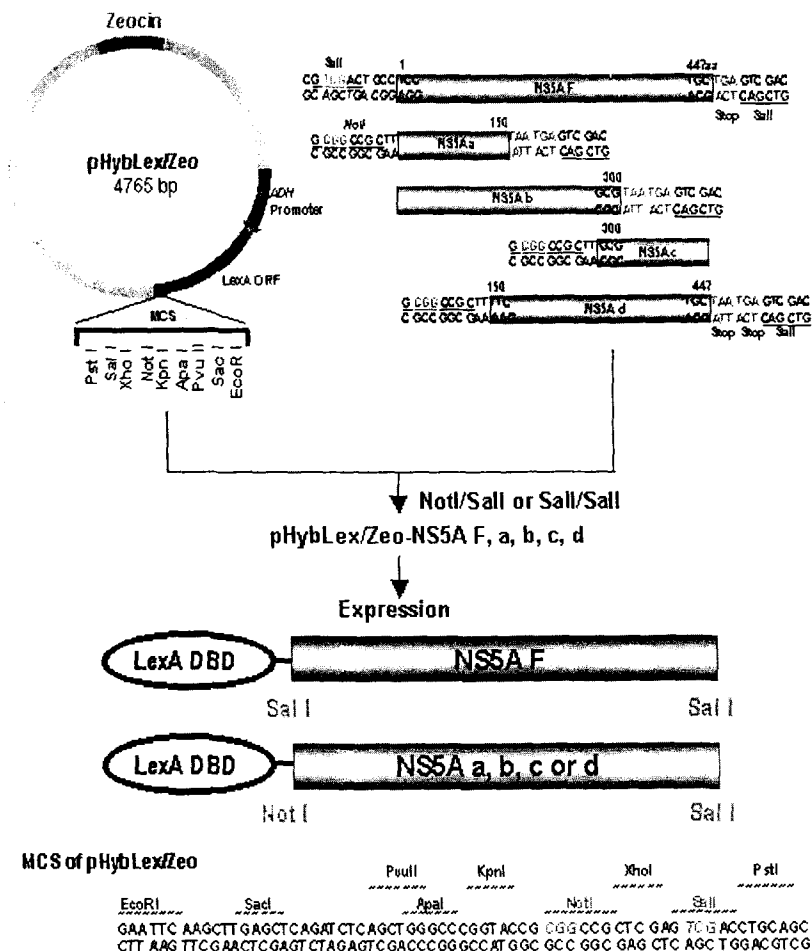


Figure 1. Construction of the bait plasmids : pHybLex/Zeo-NS5A-F, -a, -b, -c, and -d

pHybLex/Zeo-NS5A-F was constructed by the SalI-SalI fragment from the pGEM-TNS5A-F into the Sal I-digested pHybLex/Zeo. pHybLex/Zeo-NS5A-a, -b, -c and -d were constructed by the same strategy above. The ADH1 promoter of pHybLex/Zeo which is a strong, constitutive expressed, is used for LexA fusion with the bait plasmids

Table 1. PCR primers used to construct bait plasmids

A. PCR primers used to construct pHybLex/Zeo-NS5A-F

Primer	Primer sequence	Restriction site	Size (mer)
NS5A (Full-F)	5'-CGTCGACTGCCTCCGGCTCGTG3'	Sal I	21
NS5A (Full-R)	5'-GTCGACTCAGCAGCAGACGAC-3'	Sal I	21

B. PCR primers used to construct pHybLex/Zeo-NS5A-a, -b, -c, and d

NS5A (150-F)	5'-GCGGCCGCTTTTCACAGAATTGGATGGGGTGC-3'	Not I	31
NS5A (300-F)	5'-GCGGCCGCTTGCGGAGATCCTGCGGAGAT-3'	Not I	29
NS5A (150-R)	5'-GTCGACTCATTAGAAGAATTCAGGGGCCGAA-3'	Sal I	32
NS5A (300-R)	5'-GTCGACTCATTACGCCGGAACGGATACTTCCC-3'	Sal I	32
NS5A (447-R)	5'-GTCGACTCATTAGCAGCAGACGACGTCC-3'	Sal I	28

C. Combination of primers used to construct pHybLex/Zeo plasmid

PCR Product	Primer
NS5A Full length	NS5A (Full-F) + NS5A (Full-R)
NS5A-a	NS5A (1-F)+ NS5A (150-R)
NS5A-b	NS5A (1-F)+ NS5A (300-R)
NS5A-c	NS5A (300-F)+ NS5A (447-R)
NS5A-d	NS5A (150-F)+ NS5A (447-R)

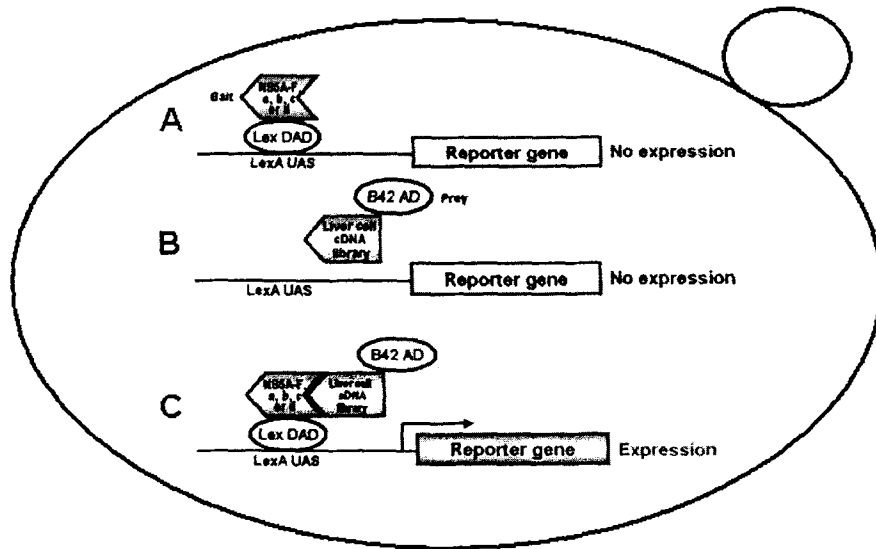


Figure 2. Schematic illustration of Yeast two-hybrid system (Invitrogen)

The Hybrid Hunter Two-Hybrid System is based on the fact that transcription factors are comprised of two domains, a DNA binding domain (DBD) and an activation domain (AD). In this hybrid system, two separate hybrid proteins are constructed. The first hybrid protein is the LexA DBD/Bait fusion (Figure A) while the second hybrid protein is the B42 AD/Prey (cancer cDNA library) fusion (Figure B). Prey can be replaced with a cDNA library in order to screen for unknown proteins that interact with the bait of interest. These two hybrids are on separate plasmids and are transformed into a yeast strain that contains two reporter genes (an auxotrophic marker and *lacZ*). The regulatory regions for these two reporters contain the LexA DNA binding sites (operator sequences) that act as upstream activating sequences (UAS) in yeast. If bait interacts with prey in the nucleus, this will bring the activation domain together with the DNA-binding domain to reconstitute transcriptional activation and result in expression of the reporter genes (Figure C). Positive interactions can be detected by selecting on plates lacking the auxotrophic marker, followed by a second screen for β -galactosidase expression.

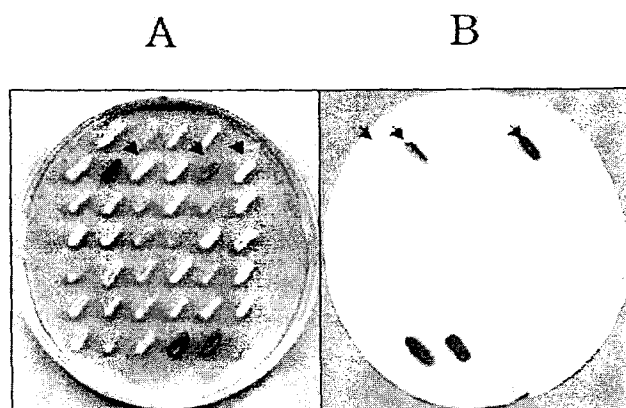


Figure 3 . Confirmation of positive clones using the β -galactosidase assay.

(A) β -galactosidase plate (SD-WHU/X-gal) assay. The yeast cotransformants were patched on SD-WHU/X-gal plate. The color of cotransformants containing the bait and prey plasmids turns into blue because of the reporter gene *lac Z*. (B) Cotransformants were lifted from SD-WHU plate into Whatman filter paper, and the filter was incubated in X-gal/Z buffer solution. The arrows indicate positive cotransformants

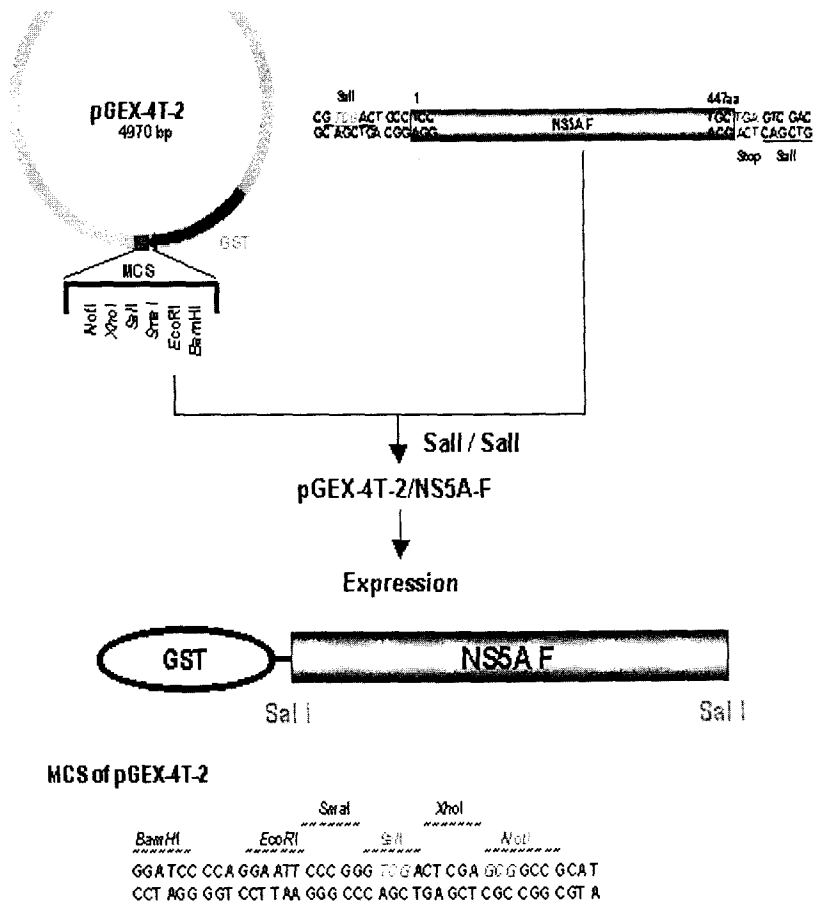


Figure 4. Construction of pGEX4T-2/NS5A

pGEX-4T-2/NS5A was constructed by inserting the SalI - SalI fragment from pHybLex/Zeo-NS5A-F plasmid into SalI site of the pGEX4T-2 plasmid. pGEX-4T-2/NS5A-F were constructed by inserting each of NotI-SalI fragment from pHybLex/Zeo-NS5A-F plasmid into the NotI-SalI site of pGEX-4T-2.

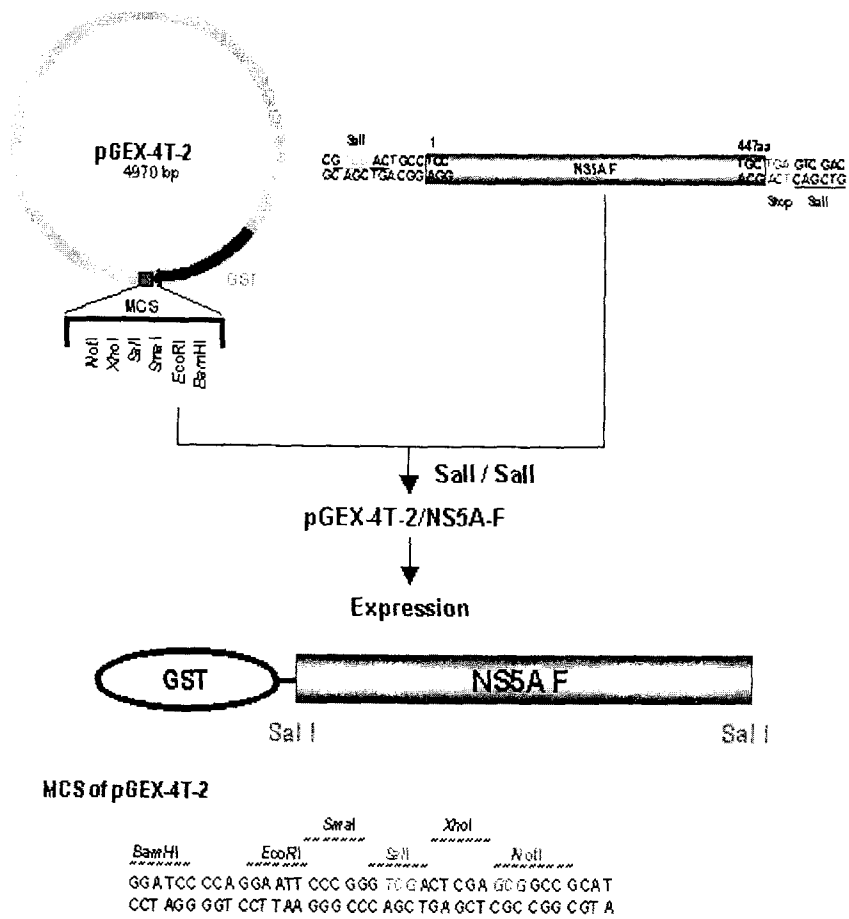


Figure 5. Construction of the pMAL-cri/c14, c18, c39, c45 and c78 plasmids.
The pMAL-cri/c14, c18, c39, c45 and c78 were constructed by inserting in EcoRI-BamHI-digested pMAL-cri.

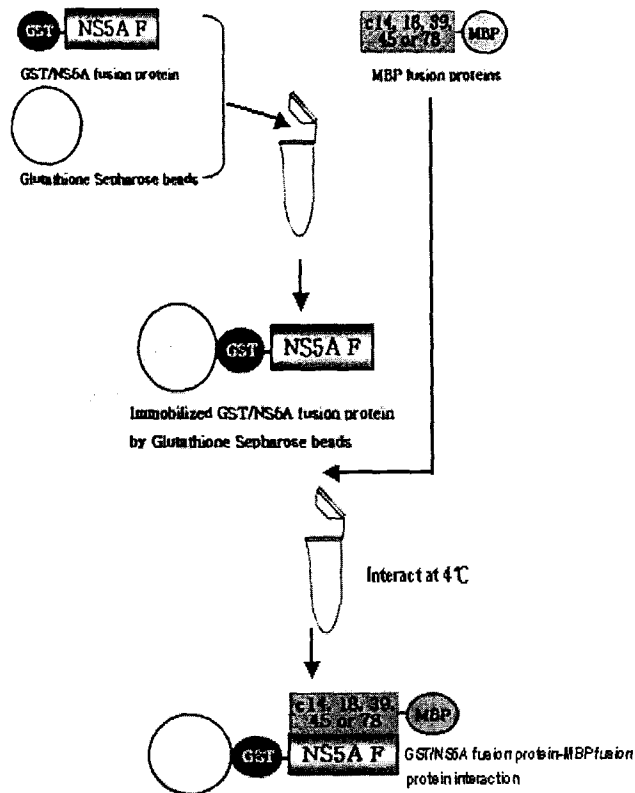


Figure 6. Schematic illustration of *in vitro* binding assay

The GST/NS5A-F fusion protein and its interacting proteins were resolved on SDS-PAGE gels, analyzed by western blot, and subjected to autoradiography for visualization.

3.2. 실험 결과

3.2.1. Self-activation test of bait plasmids

HCV 1b형의 NS5A와 상호 결합하는 숙주세포 단백질을 발굴하고자 NS5A full-length (1~447aa)를 bait로 이용하였다. 그러나 NS5A내에 putative transcriptional activation domain과 cleavage site가 존재하므로 실험상 편의를 위하여 4종류의 NS5A domain 즉 NS5A1~150aa, NS5A1~300aa, NS5A300~447aa 그리고 NS5A150~447aa으로 나누었으며 각각을 NS5A-a, NS5A-b, NS5A-c 그리고 NS5A-d라 명명하였고 이들을 bait로 하여 yeast two-hybrid screening을 수행하였다. Large scale yeast two-hybrid screening을 수행하기 앞서, 각 bait의 non-specific activation 여부를 확인하기 위하여 filter-lift -galactosidase assay를 실시하였다. 그 결과, NS5A-d 만이 자체 전사활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 이러한 관찰로 NS5A의 150~447aa 영역에 transcriptional activation domain이 존재함을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 사실은 이미 보고된 바 있다 (Goh *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1997; Pawlotsky and Germanidis, 1999; Tanimoto *et al.*, 1997).

3.2.2. Identification of interacting proteins by yeast two-hybrid

Bait plasmid (pHybLex/Zeo-NS5A-F, a, b, c 그리고 d)와 prey plasmid (pYESTrp2-human liver cancer cDNA library plasmid)를 large scale로 yeast 내에 cotransformation한 뒤 (efficiency 는 약 5×10^6 였다) (Table 3). X-gal plate와 filter-lift -galactosidase assay를 통해 blue positive clone 들을 획득하였다. Positive cotrans-formants로부터 plasmid를 분리하였고, 다시 *E. coli* DH5에 형질전환시켜 plasmid를 분리한 다음, 제한 효소로 절단하여 insert 존재 여부를 확인하였다. insert가 확인된 clone 들을 sequencing (KRIBB)한 뒤, NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하여 frame이 맞는지를 확인하였고, NS5A-F, NS5A-b, 그리고 NS5A-c 와 상호 결합하는 숙주세포 내 단백질군을 Table 7과 같이 발굴하였다. HCV의 NS5A full-length 와 상호 결합하는 3종류의 단백질, 즉 hTcD37, AHNAK-related protein, 그리고 Secreted Frizzled-Related Protein 4 (SFRP4)을 발굴하였다. 또한 NLS-masking sequence를 포함하는 NS5A-b와 상호 결합하는 N-myc Downstream Regulated Gene 1 Protein (NDRG1) Matrix Gla Protein (MGP), Serine/ threonine Protein Phosphatase 2A, regulatory subunit (PP2A)를 발굴하였다. ISDR (interferon sensitivity-determining region)과 mitogenic signaling에

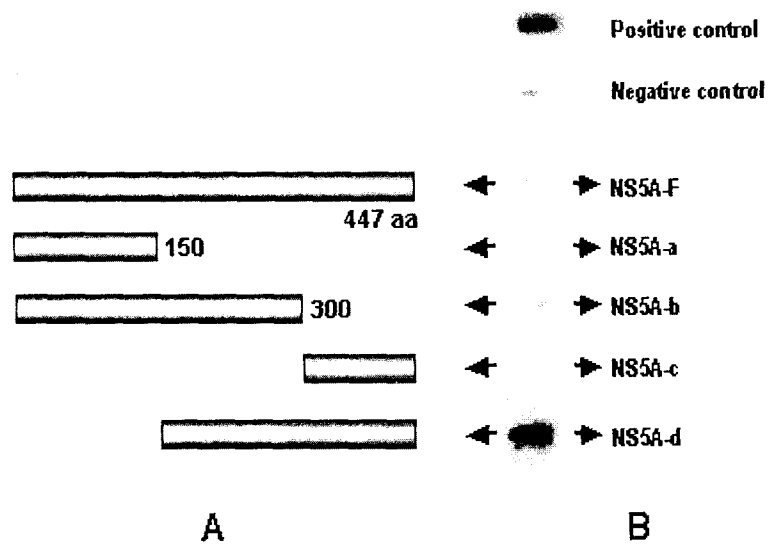


Figure 7. Self-activation test for non-specific activation of bait plasmids

(A) Schematic drawings of the NS5A derivatives used in the test (B) self-activation test of controls (upper panel) and the NS5A derivatives (lower panel)

Table 3. Summary of the yeast two-hybrid screening

	F	a	b	c	d
Control					
No. of clones screened	5 x 10 ⁶				ND
No. of blue clones	89	3	10	82	ND
No. of confirmed clones	3	-	3	12	ND
No. of <i>in vitro</i> binding assay	1	-	-	5	ND

관여하는 Grb2가 binding하는 것으로 보고된 SH3-motif 및 NLS (nuclear localization signal)를 포함하는 NS5A-c와 상호 결합하는 Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1 (CRABP-I), Ferritin Heavy Chain (FTH1), Translok인, SVAP1 protein, Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K), Human U1 Small Ribonucleoprotein 70 kDa protein (SRNP), Prothymosin Alpha, pro alpha 1(I) collagen (COL1A 1)와 Centaurin Delta 2 (CENTD2, Rho-GAP domain 함유) 그리고 3종류의 unknown protein, 즉 CTD-253719 (gi: 21743742), 및 MGC 2574 (gi: 12655057), Human chromosome 9 open reading frame 6 (gi: 12002684)을 발굴하였다 (Table 4). 그리고 yeast cotransformants로부터 분리해낸 plasmid와 여러 bait plasmid를 다시 yeast에 cotransformation하여 -galactosidase assay를 실시하여 self-activation 여부와 상호 결합 여부를 확인하였다. 그 결과, 각 clone 들이 self-activity 가 없는 것으로 확인되었다. NS5A-c와 상호 결합하는 단백질군 중 CRABP-I, CTD-253719, Translok인 그리고 MGC 2574는 NS5A-F와도 상호 결합함을 확인하였다 (Table 4).

3.2.3. Domain analysis of clones

Yeast two-hybrid를 통해 발굴한 단백질들 중 의미 있는 clone을 찾기 위해 NCBI conserved domain search program을 이용하여 각 단백질에 대한 conserved domain을 조사하였다 (Figure 8). 그 결과, hTcD37에는 DHH2 domain이 있는 것으로 확인하였다. 이 domain은 120개의 잔기로 이루어져 있으며 GTPase activating protein임을 확인하였다. 그리고 SFRP4에는 cysteine이 풍부하며 G-protein과 유사한 Frizzled (Fz) domain이 존재하는 것으로 확인하였으며, 그 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. NDRG1에는 Ndr family domain이 존재하는데, 이 family는 Ndr1/RTP/Drg1, Ndr2, Ndr3로 이루어져 있다. 그 기능에 대해서는 여전히 밝혀지지 않았지만 cellular differentiation에 관여하리라 추정되고 있다. Ndr1 단백질은 retinoic acid와 같은 chemical에 의해 differentiation이 유도될 때 재활성되며, 또한 여러 chemical에 의해 그 발현이 활성화되는데, tunicamycin과 homocysteine은 umbilical endothelial cell에서 Ndr1의 발현을 유도하며 nickel은 여러 cell type에서 Ndr1을 유도한다고 한다. MhpC domain도 존재하는데, 이 domain은 hydrolase 또는 acyltransferase (alpha/beta superfamily) 라고 알려져 있다. 이다. MGP에는 GLA domain이 존재하는데 이 domain에는 gamma-carboxyglutamate 잔기를 포함하고 있으며 extracellular matrix, cell adhesion 그리고 cell migration과 관련 있는 단백질에서 발견되는 hyaluronan-binding domain으로서 calcium ion과의 친화력이 강하다. PP2A에는 fission yeast의 CDC55, Serine/threonine protein phosphatase 2A, regulatory subunit와 homology를 갖으며, WD40 domain이 존재한다. 이 domain은 많은 eukaryotic proteins에서 발견되며 signal transduction, pre-mRNA processing 및 cytoskeleton assembly시 adaptor/regulatory modules로서의 기능을 포함한 다양한 기능을 한다. 전형적으로 N-말단에




11~23잔기로 이루어진 GH dipeptide가 존재하며 C-말단에는 40개의 잔기로 이루어진 WD dipeptide가 존재하므로 D40라 일컫는다. CRABP1에는 lipocalin domain이 존재하는데, 이 domain은 cytosolic fatty-acid binding protein family에 속하며, lipids, steroid hormones, bilins 그리고 retinoids와 같은 small hydrophobic molecules를 운반하는 transporter이다. Retinoic acid (RA)는 *in vivo* and *in vitro*에서 human epidermal cells의 growth와 differentiation에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Retinoids는 vitamin A의 유도체로서 여러 조직이 발달하여 vision, growth 그리고 reproduction과 같은 기능을 유지하기 위한 배발생시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CRABP I은 retinoic acid가 핵에 도달하지 못하게 하거나 retinoic acid를 cytoplasm에서 핵으로의 transport에 영향을 준다 (Boylan and Gudas, 1991). FTH1에는 Ferritin-like domain이 존재하며, Translokin에는 chromosome segregation ATPase인 smc domain이 있는 것으로 확인하였다. 그리고 COL1A1에는 COLFI (Fibrillar collagen C-terminal domain)과 VWC (von Willebrand factor (vWF) type C domain)이 존재하며, PI4K에는 phosphoinositide 3-kinase(PI3K), catalytic domain (PI3Kc)이 존재하는데, PI3K는 cell motility, Ras pathway, vesicle trafficking 및 secretion, 그리고 apoptosis 등의 다양한 과정에 관여한다. 이들 homologue는 lipid kinases 와/또는 protein kinase일 수도 있다. lipid kinase일 경우, inositol phospholipid의 inositol ring 3번 위치를 인산화한다. 일부는 PI4K activity를 갖는다. PI4K에는 PI3K family, accessory domain (PI3Ka)와 PIK domain도 존재하는데, 이 domain은 모든 PI3K 와 PI4K에 존재하며 그 기능은 명확하지 않다. CENTD2에는 RhoGAP, Pleckstrin Homology (PH) domain이 존재하는 것으로 확인하였다. 그리고 B link program을 통해 hTcd37은 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)의 *Ppx1*과 44% 정도 유사하고, PP2A는 *S. pombe*의 *Pab1+*와 69% 정도 유사하며, PI4K는 *S. pombe*의 PI4K와 45% 정도 유사하는 것으로 확인하였다. 그리고 CENTD2는 *S. pombe*의 Rho-like GTPases에 대한 GTPase-activator 와 53% 정도 유사하는 것으로 확인하였으며, *S. pombe*를 이용하여 이들 단백질의 기능을 더욱 심도 있게 연구할 예정이다.

3.2.4. *In vitro* binding assay







NS5A-F는 GST에 fusion 시켰고, 각 clone에 대한 back transformation과 domain analysis를 통해 5종류의 clone, 즉 c14 (CRABP-1), c18, c39, c45 (PI4K) 그리고 CENTD2 (c78)을 선택한 후 MBP에 fusion 시켜 각각 *E. coli*에서 발현되는지를 확인한 다음 (Figure 9), GST pull-down assay 와 MBP pull-down assay를 방법을 이용한 *in vitro* binding assay를 실시한 결과, 각 clone들이 *in vitro*에서 NS5A-F와 직접적으로 상호 결합함을 확인할 수 있었다 (Figure 10).

Table 4. List of proteins interacting with NS5A-F, -a, and -c

























Proteins interacting with NS5A Full length

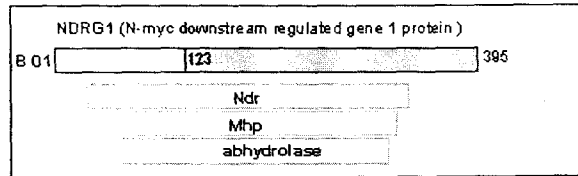
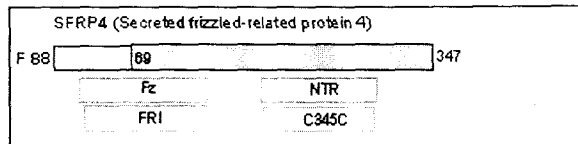
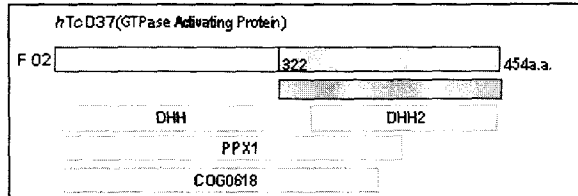
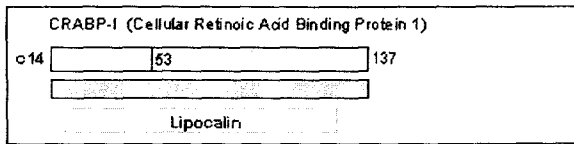
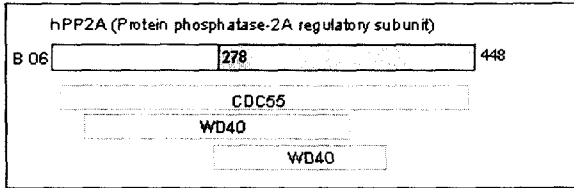
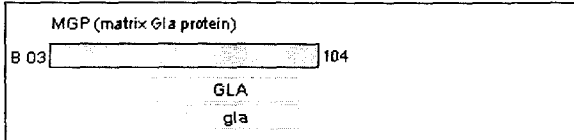
Name of Clones	Genes	β -Gal Filter assay
hTCD37	hTCD37 (TcD37 homolog)	
AHNAK	AHNAK-related protein	
SFRP4	SFRP4 (Secreted frizzled-related protein 4)	

Proteins interacting with NS5A-b

Name of Clones	Proteins	β -Galactosidase Filter assay	
		Domain b	Full
b01	NDRG1(N-myc downstream regulated gene protein 1)		
b03	MGP(matrix Gla protein)		
b06	PP2A(Protein phosphatase-2A subunit a)		

Proteins interacting with NS5A-c

Name of Clones	Proteins	β -Galactosidase Filter assay	
		Domain c	Full
c14	CRABP-I(Cellular retinoic acid binding protein 1)		
c18	Human chromosome 19 clone CTD-253719		
c22	FTH1(ferritin heavy chain)		
c26	Similar to KIAA0092 gene product		
	Similar to RIKEN cDNA 4921510P06 gene		
c39	Unknown (Protein for MGC 2574)		
c44	SVAP1 protein(Synapsomal-associated protein)		
c45	PI4K230(Phosphatidylinositol 4-kinase 230)		
c62	Small ribonucleoprotein 70 kd protein		
c66	Prothymosin α		
c75	COL1A1[Pro alpha 1(I) collagen]		
c78	CENTD2(Centaurin delta 2, isoform b)		
c80	GCV-H(G cleavage H-protein)		



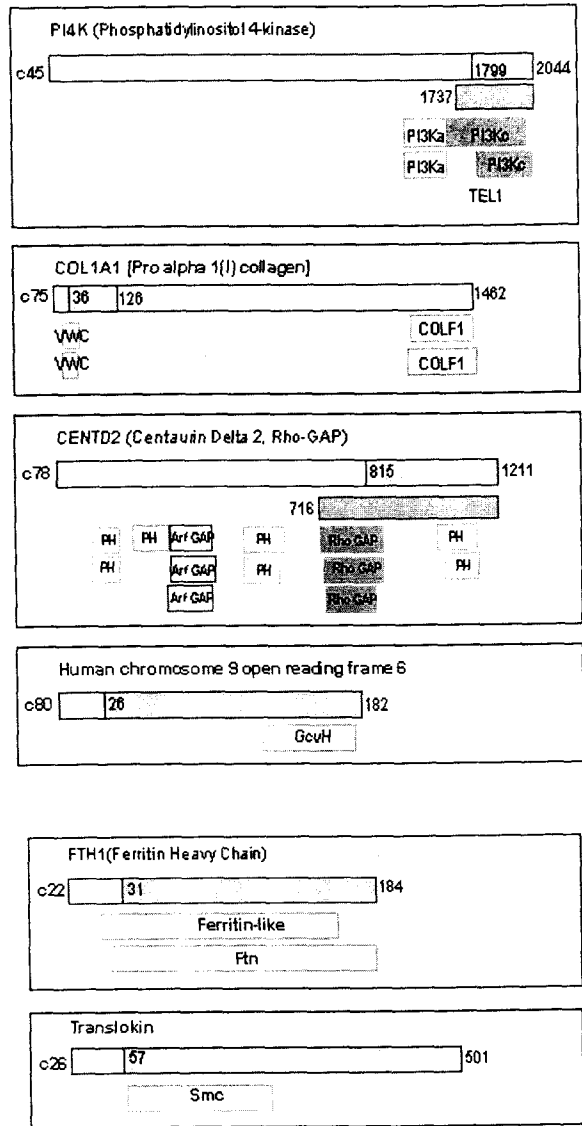


Figure 8. Schematic drawings of the results of domain analyses

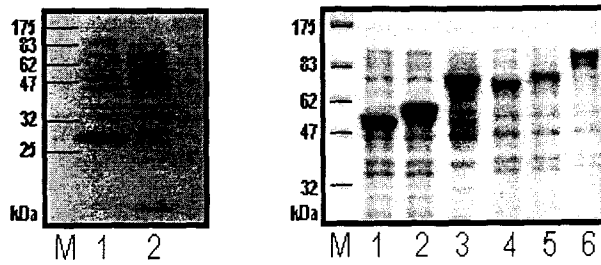


Figure 9. Expression of GST and MBP fusion proteins

(A) Lane M : Marker, lane 1 : GST only, lane 2 : GST/NS5A-F. (B) Lane M : Marker
 lane 1 : MBP only, lane 2 : MBP/c14, Lane 3 : MBP/c18, Lane 4 : MBP/c39, Lane 5
 MBP/c45, lane 6 : MBP/c78

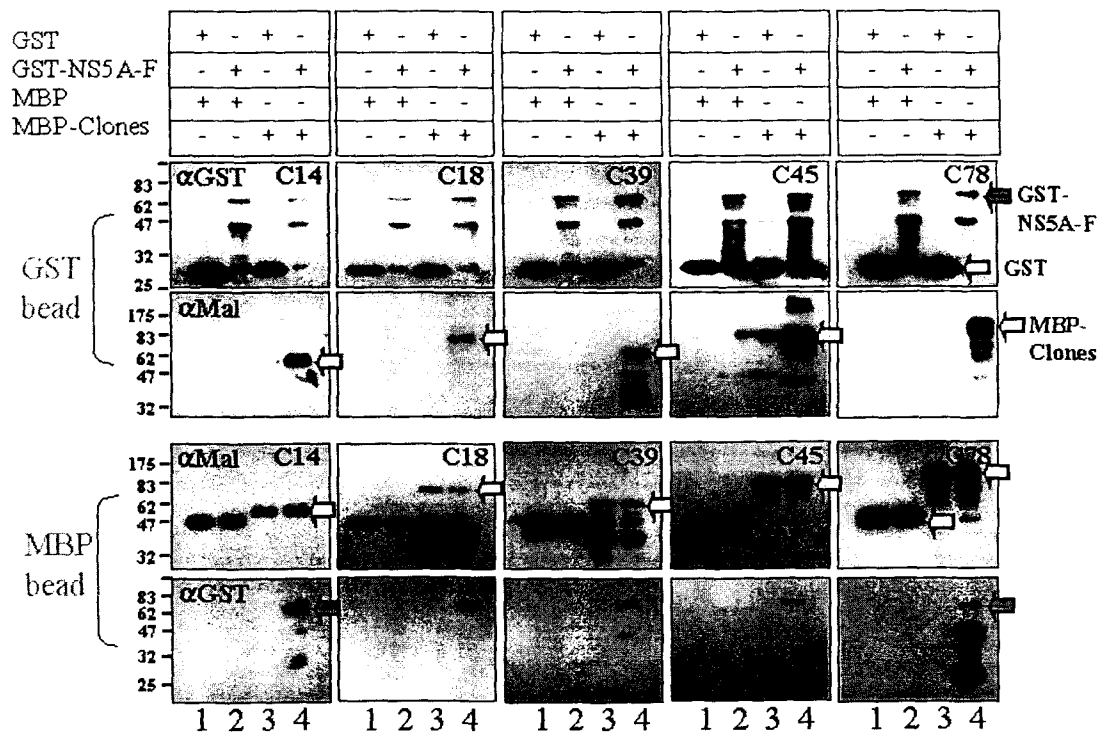


Figure 10. *In vitro* interaction of NS5A-F with c14, c18, c39, c45, and c78

GST pull-down assay (upper) and MBP pull-down assay (lower) : GST, GST/NS5A-F, MBP, and/or MBP/c-derivatives were mixed up as indicated on the top of the figure, resolved by PAGE, and subjected to western blot analysis The upper and lower pairs of panels show the results of western blot with anti-GST antibody and anti-Mal antibody, respectively.

3.3 연구 고찰

HCV는 숙주세포의 세포막을 통과해서 viral genome이 숙주세포의 세포질 내에서 translation 된다. Polyprotein은 processing 과정을 거치고 소포체 막에 단단히 결합된다. minus-strand RNA가 replicase complex 내에서 합성되어 plus-strand RNA의 합성시 주형으로 이용된다. Structural protein과 상호 작용함으로써 plus-strand RNA는 capsid로 둘러싸이게 되며 virus particle은 소포체의 lumen으로 들어간 뒤 Golgi complex를 통해 숙주세포 밖으로 빠져 나오게 된다 (Bartenschlager and Lohmann, 2000) 이와 같은 life cycle을 갖는 것으로 추정되지만 정확하게 밝혀지지는 않았다.

HCV가 숙주세포 내에 침입하여 숙주세포의 항 바이러스 작용을 방해하는 기작을 밝혀 HCV에 대한 백신개발이 이루어져야 할 것이다. 현재로서는 감염치료제로서 인터페론이 유일하며 숙주세포의 인터페론 반응이 바이러스 감염을 막는 인체의 첫번째 방어 기작 중의 하나이다. 그러나 우리나라에서 주로 분포하고 있는 HCV 1b형의 경우 인터페론에 의한 치료효과가 매우 낮아 HCV에 대한 백신개발이 시급하다. 이 백신개발은 HCV의 genome이 복제되는 단계와 virus particle이 숙주세포로부터 빠져 나오는 단계를 막는든지 HCV의 polyprotein들의 기능을 밝힘으로써 가능하리라 생각된다. 따라서 많은 연구자들이 HCV의 polyprotein과 상호 결합하는 숙주세포 내 단백질을 발굴하고 polyprotein 과 발굴한 단백질과 상호관계를 조사하여 HCV가 숙주세포의 항 바이러스 작용을 방해하여 만성간염, 간경화, 간암 등의 간질환을 일으키는 기작을 규명하기 위해 노력하고 있다. 특히 최근에는 인터페론의 작용을 방해하리라 생각되는 영역을 갖는 NS5A에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으나, 아직까지 NS5A의 기능에 대해 명확하게 밝혀진 바가 없다. 서론에서도 언급했듯이 이전의 많은 연구들은 NS5A를 인터페론의 항 바이러스 효과에 대한 HCV의 내성과 관련되어 이루어졌다 (He and Katze, 2002; Pawlotsky, 1998). 그러나 그 host molecular target에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 가장 믿을만한 보고는 우리나라에 주로 분포하고 있는 HCV 1b의 NS5A가 인터페론에 대한 effector로서 viral RNA transcription 및 translation 억제에서 viral transcripts의 degradation에 이르기까지 다양한 level에서 viral gene expression을 억제하는 등 항 바이러스 작용을 하는 PKR과 결합하여 그 activity를 억제한다는 보고가 있다 (Gale *et al.*, 1998, 1997; Girard *et al.*, 2002; He and Katze, 2002; Polyak *et al.*, 2001). 또한 PKR은 항 바이러스 작용 이외에 signal transduction pathway에 작용하여 전사수준에서 gene expression을 조절하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Tan and Katze, 1998). 그리고 최근 NS5A가 다양한 cellular protein 과 결합하여 anti-apoptotic과 oncogenic property와 직접적으로 연관되어 있으며 (He and Katze, 2002; Pawlotsky, 1998) cell cycle과 cell growth 에 영향을 줄 것이라 보고하고 있다. NS5A가 cell cycle regulatory genes을 modulation시켜 cell growth를 촉진한다는

실험적 예도 있다 (Ghosh *et al.*, 2000). Tumor suppressor protein인 p53 은 DNA repair, apoptosis 그리고 antioxidant response에 관여하는 것으로 알려져 있는데, NS5A가 p53과 결합함으로써 그 작용을 억제한다는 보고도 있다.

이런 보고들과 달리 본 연구에서는 NS5A gene (full-length)을 효모에 형질전환시킨 뒤 cell을 키우는 과정에서 cell growth가 늦어지는 현상과 septum이 많이 생기는 것을 관찰하였다. 또한 NS5A-a를 bait로 한 yeast two-hybrid screening에서 획득한 positive colony 또한 세포가 aggregation 되는 등 세포성장이 저해되는 현상을 관찰하였다. 이는 Cdk1/2-cyclin complex에 의한 세포주기를 교란시킨다는 보고, 즉 NS5A가 세포주기 조절에서 S phase는 줄이고 G2/M phase는 늘려서 세포성장 저해효과를 보여주기도 한다는 보고와 일치하는 현상이라고 할 수 있다 (Arima *et al.*, 2001). NDRG1은 N-myc down-regulated gene (NDRG) family에 속하고 주로 상피세포의 세포질에 존재하며 (Lachat *et al.*, 2002) 다양한 physiological 그리고 pathological 조건 (hypoxia, cellular differentiation, heavy metal, N-myc 그리고 neoplasia) 하에서 NDRG1 transcription, mRNA stability, 그리고 translation이 변한다.

NS5A에는 cellular signaling molecule에서 발견되는 Src homology (SH)3-binding site와 일치하는 proline-rich 영역(PXXP motif)이 두 군데, 즉 class I SH3-binding motif와 class II SH3-binding motif가 존재한다. 특히, Grb2와 직접 상호 결합함으로써 mitogenic signaling pathway의 viral inhibitor로 작용한다고 보고되어 있다. Grb2는 SH3 domain을 갖는 adaptor protein로 growth factor의 자극을 받으면 guanine nucleotide exchange factor, Son of sevenless (Sos) 1/2와 complex를 형성함으로써 intracellular signaling을 매개한다. 이 과정동안 Sos가 Ras-MAPK pathway를 작동시킨다(Cross *et al.*, 2000). 그러나, NS5A의 발현이 ERK의 인산화를 억제한다는 것이 밝혀졌으며 또한 NS5A에 의한 MAPK pathway의 교란은 MAPK pathway와 JAK/STAT pathway사이의 cross-talk때문에 인터페론 signaling pathway에 영향을 주는 것일지도 모른다 (He and Katze, 2002; Tan and Katze, 2001; Tan *et al.*, 1999). 또한 NS5A가 Grb2와 결합할 수 있다는 사실을 보더라도, NS5A가 mitogenic pathway의 viral inhibitor임을 암시한다.

본 연구에서도 Figure 11에서 보는 바와 같이 MAP kinase pathway와 관련된 단백질들을 발굴하였다. Grb2-NS5A complex를 형성한 뒤 Ras GAP인 hTcd37을 자극하여 Ras를 불활성시키고, Rho-GAP domain을 갖는 CENTD2를 자극하여 cell spreading 과 vesicle traffic등 cell movement, cell survival 및 differentiation을 방해한다고 생각할 수 있다. 그러나 polyphosphoinositides는 eukaryotic cell에서 많은 signal pathway에 관여하는데, 그 첫번째 단계가 바로 PI4K에 의해 phosphatidylinositol 4-phosphate가 형성되는 것이다 (Gehrmann and Heilmeyer, 1998). PI4K에는 PI3Kc, SH3 domain, proline rich domain(PXXPP, PXXXXPPPXXP), nuclear targeting signal, leucine zipper, helix-loop-helix motif,

lipid-kinase unique domain, PH domain 존재하는데, phosphoinositide 3-kinase는 cell motility, Ras pathway, vesicle trafficking 및 secretion 그리고 apoptosis 등의 다양한 과정에 관여한다. 이들 homologue는 lipid kinases 또는 protein kinase 혹은 두 효소의 기능을 할 수도 있다. lipid kinase일 경우, inositol phospholipid의 inositol ring 3번 위치를 인산화한다. 그리고 PI4K에는 PI3Ka와 PIK domain도 존재하는데, 이 domain은 모든 PI3K와 PI4K에 존재하며 그 기능은 명확하지 않다. 따라서 NS5A의 proline rich region에 PI4K의 SH3 domain이 결합하여 활성화가 되고 계속적으로 phosphatidylinositol cascade를 자극하여 Ca²⁺를 방출케 하여 결국 NF- κ B를 activation시켜 anti-apoptotic gene의 발현을 유도하리라 생각된다. 또한 NS5A-b와 상호 결합하는 단백질 중 PP2A(protein phosphatase 2A)는 cell growth에 긍정적인 작용과 부정적인 작용을 한다. Cell survival에 필수적인 단백질이면서 tumor 생성을 억제하는 작용을 하는데, 이 tumor 억제 효과는 PP2A regulatory subunit에 의해 결정된다는 보고가 있다 (Schonthal, 2001). 또한 NS5A-b 와 상호 결합하는 positive yeast colony를 키우는 과정에서 cell growth가 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다. NS5A가 PP2A와 결합하여 PP2A의 tumor suppressor로서 기능을 억제하리라 생각된다.

따라서 본 연구에서 발굴한 단백질들이 주로 숙주세포의 apoptosis, cell differentiation 그리고 cell migration 등의 cell survival과 관련 있는 MAP kinase pathway에 관여하는 단백질군임을 볼 때, HCV의 NS5A가 이러한 MAP kinase pathway를 교란시켜 숙주세포의 항 바이러스의 작용을 방해한다는 기존의 여러 보고와 일치하는 결과이다. 앞으로 이들 발굴한 단백질들의 기능을 심도 있게 규명한다면 NS5A를 매개로 한 HCV의 숙주세포 단백질군에 대한 방해 기전을 밝힘으로써 HCV에 대한 백신을 포함한 치료약 개발에 기여하리라 생각된다.

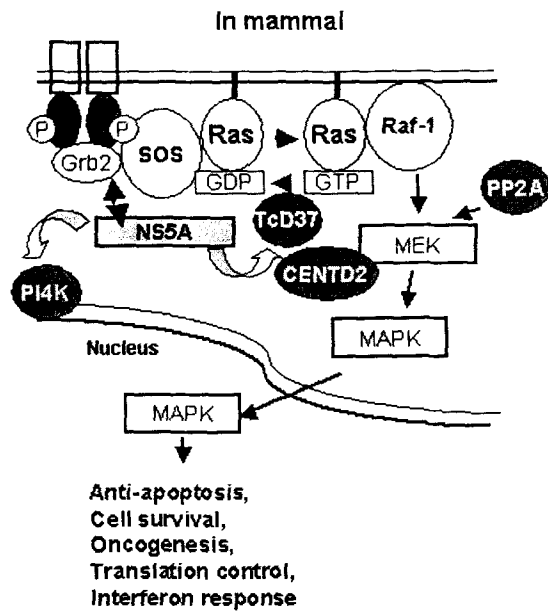


Figure 11. Summary of identified clones interacting with NS5A

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4.1 총괄 년차별 목표달성도

구분	연구목표	연구내용	달성도 (%)
1차년도 (2000)	HCV의 NS5A, Core, 혹은 E2와 결합하는 단백질군 3개 이상 발굴	yeast two-hybrid 준비 및 실험 수행	100%
2차년도 (2001)	HCV의 NS5A, Core, 혹은 E2와 결합하는 단백질군 3개 이상 발굴하고 기능을 추정함	yeast two-hybrid 실험 및 in vitro binding assay	90%
3차년도 (2002)	신규 숙주세포의 단백질의 기능을 세포수준에서 규명함	In vivo, in vitro binding assay와 발굴된 숙주세포 단백질을 세포에서 발현하여 숙주세포의 signaling이 영향을 받는지 관찰한다.	80%

4.2 세부 목표달성도

목 표	달 성 도 (%)	내 용
bait로 사용될 pHybLex/Zeo-NS5A와 pHybLex/Zeo-Core 플라스미드의 제조	100	Yeast two hybrid 실험의 bait로 사용될 pHybLex/Zeo-NS5A 계열과 (4개의 조각으로 나눈 클론 포함) pHybLex/Zeo-Core를 클로닝하고 DNA sequencing으로 확인하였다.
pHybLex/Zeo-NS5A bait의 특성 검증	100	숙주로 사용될 yeast L40 균주에 형질전환 시킨 후에 자체의 전사촉진 성질이 없는 사실을 확인하고, 숙주 효모에 대한 성장 저해 효과가 심각함을 확인하였다.
Yeast two hybrid screening: 가짜 시그날의 제거와 플라스미드의 Sequencing and database search	100	두 번의 색깔 선택에 의하여 가짜를 제거하고, 남는 것을 sequencing하여 in frame으로 맞는 HTcD37 유전자를 최종적으로 선택하였다. in vitro상의 단백질 결합을 확인하였고 현재 그 기능 연구가 진행중이다.
발굴된 단백질 유전자의 전사 혹은 발현 검증 및 상호 작용기전 연구	80	HTcD37 유전자가 간세포에서 발현되는지를 RT-PCR로 검증하였다. 상호 결합이 특이적인지 여부를 판단하기 위하여, NS5A와 HTcD37을 mammalian two hybrid 시스템에서 검증 중이며, GAP inhibition assay를 통한 기능을 관찰하고자 한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

HCV의 NS5A와 상호결합하는 숙주세포 단백질군의 상당수가 Ras 신호전달계를 교란하는 작용을 통하여 숙주세포의 면역체계를 탈피하고, 간암의 발병 원인을 제공할 것으로 사료된다. 향후 이런 방향의 추가 기능연구를 통하여 간암의 발병원인을 규명하고 간암 예방의 선도 분자표적을 발굴하는데 사용하고자 한다.

본 실험의 결과는 NS5A가 Ras의 signaling 과 관계가 있으며, 동시에 간세포의 지방 축적과도 관련이 있다는 결과를 보여주고 있다. 또한 기존의 Src 도메인 이외에도 PH 도메인이 숙주세포의 단백질군과 관련이 있다는 최초의 보고이다.

본 결과를 이용하여 NS5A의 기능을 규명함으로써, HCV에 대하여 더 잘 알게 됨으로서, 간암 바이러스의 간에서의 증식 작용기전을 연구하게 되어서, 좋은 치료제를 개발할 수 있는 작용점을 발굴할 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 참고문헌

1. Arima, N., Kao, C. Y., Licht, T., Padmanabhan, R., and Sasaguri, Y. (2001). Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A, *J Biol Chem.* 276. 12675-84.
2. Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus, *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 14. 241-54.
3. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1991). Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP- I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells, *J Cell Biol.* 112. 965-79.
4. Chung, K. M., Lee, J., Kim, J. E., Song, O. K., Cho, S., Lim, J., Seedorf, M., Hahm, B., and Jang, S. K. (2000). Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin beta3, *J Virol.* 74. 5233-41.
5. Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J. M. (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis, *Exp Cell Res.* 256. 34-41.
6. Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., and Katze, M. G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance, *Clin Diagn Virol.* 10. 157-62.
7. Gehrmann, T., and Heilmeyer, L. M., Jr. (1998). Phosphatidylinositol 4-kinases, *Eur J Biochem.* 253. 357-70.
8. Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Yaciuk, P., Chrivia, J., Ray, R., and Ray, R. B. (2000). Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP, *J Biol Chem.* 275. 7184-8.
9. Girard, S., Shalhoub, P., Lescure, P., Sabile, A., Misek, D. E., Hanash, S., Brechot, C., and Beretta, L. (2002). An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis, *Virology.* 295. 272-83.
10. Goh, P. Y., Tan, Y. J., Lim, S. P., Lim, S. G., Tan, Y. H., and Hong, W. J. (2001). The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage, *Virology.* 290. 224-36.
11. He, Y., and Katze, M. G. (2002). To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon, *Viral Immunol.* 15. 95-119.

12. He, Y., Tan, S. L., Tareen, S. U., Vijaysri, S., Langland, J. O., Jacobs, B. L., and Katze, M. G. (2001). Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A, *J Virol.* 75. 5090-8.
13. Hsieh, T. Y., Matsumoto, M., Chou, H. C., Schneider, R., Hwang, S. B., Lee, A. S., and Lai, M. M. (1998). Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, *J Biol Chem.* 273. 17651-9.
14. Jin, D. Y., Wang, H. L., Zhou, Y., Chun, A. C., Kibler, K. V., Hou, Y. D., Kung, H., and Jeang, K. T. (2000). Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation, *Embo J.* 19. 729-40.
15. Kato, N., Lan, K. H., Ono-Nita, S. K., Shiratori, Y., and Omata, M. (1997). Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator, *J Virol.* 71. 8856-9.
16. Lachat, P., Shaw, P., Gebhard, S., Van Belzen, N., Chaubert, P., and Bosman, F. T. (2002). Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues, *Histochem Cell Biol.* 118. 399-408.
17. Lu, W., Lo, S. Y., Chen, M., Wu, K., Fung, Y. K., and Ou, J. H. (1999). Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein, *Virology.* 264. 134-41.
18. Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Saksela, K., and Harris, M. (2003). The hepatitis C virus NS5A protein inhibits activating protein-1 (AP1) function by perturbing Ras-ERK pathway signalling, *J Biol Chem.* 5. 5.
19. Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Ray, R., and Ray, R. B. (2001). Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner, *J Virol.* 75. 1401-7.
20. Mamiya, N., and Worman, H. J. (1999). Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase, *J Biol Chem.* 274. 15751-6.
21. Matsumoto, M., Hsieh, T. Y., Zhu, N., VanArsdale, T., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Gorbalenya, A. E., Lo, S. Y., Ou, J. H., Ware, C. F., and Lai, M. M. (1997). Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor, *J Virol.* 71. 1301-9.
22. Park, K. J., Choi, S. H., Lee, S. Y., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (2002). Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor alpha-stimulated nuclear factor kappa B activation, *J Biol Chem.* 277. 13122-8.

23. Pawlotsky, J. M. (1998). Hepatitis C virus infection: virus/host interactions, *J Viral Hepat.* 5 Suppl 1. 3-8.
24. Pawlotsky, J. M., and Germanidis, G. (1999). The non-structural 5A protein of hepatitis C virus, *J Viral Hepat.* 6. 343-56.
25. Polyak, S. J., Khabar, K. S., Paschal, D. M., Ezelle, H. J., Duverlie, G., Barber, G. N., Levy, D. E., Mukaida, N., and Gretch, D. R. (2001). Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response, *J Virol.* 75. 6095-106.
26. Schonthal, A. H. (2001). Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer, *Cancer Lett.* 170. 1-13.
27. Shi, S. T., Polyak, S. J., Tu, H., Taylor, D. R., Gretch, D. R., and Lai, M. M. (2002). Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins, *Virology.* 292. 198-210.
28. Tan, S. L., and Katze, M. G. (1998). Using genetic means to dissect homologous and heterologous protein-protein interactions of PKR, the interferon-induced protein kinase, *Methods.* 15. 207-23.
29. Tan, S. L., and Katze, M. G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A, *Virology.* 284. 1-12.
30. Tan, S. L., Nakao, H., He, Y., Vijaysri, S., Neddermann, P., Jacobs, B. L., Mayer, B. J., and Katze, M. G. (1999). NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96. 5533-8.
31. Tanimoto, A., Ide, Y., Arima, N., Sasaguri, Y., and Padmanabhan, R. (1997). The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast, *Biochem Biophys Res Commun.* 236. 360-4.
32. Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., and Lai, M. M. (1998). Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis, *J Virol.* 72. 3691-7.

제 3 부

Retroviral cDNA expression library/Proviral tagging을 이용한 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 분석

주관연구기관 : 한국생명공학연구원

연구책임자 : 김 연 수

연구원 : 조 사 연
소 인 섭
김 진 희
황 정 미

제 1 장 연구개발과제의 개요

지금까지 보고된 바이러스성 B형 간염 및 간암의 발생기전을 종합해 보면, 바이러스가 감염되면 간세포의 사멸로 인해 간염(Hepatitis)이 발생되고, 이중 일부의 간세포가 사멸기전으로부터 회피하게 되면 간암(liver cancer)으로 발전할 수 있다고 추정된다.

바이러스성 간염 및 간암은 한국인에게 가장 많이 발생하는 질환으로 간암을 치료하기 위한 여러 연구가 시도되고 있다. 간암의 주요 인자인 B형 간염 바이러스는 HBs, HBc, HBx 및 중합효소의 4개의 단백질로 구성되며, 그 중 HBx 단백질이 바이러스성 간염, 간경변 및 간암의 주요 유발인자로 알려져 있다. HBx 단백질이 세포사멸, 세포사멸 억제 및 세포성장 중지를 직접 또는 간접적으로 조절하고 있으며, 세포사멸을 유도하는 물질에 대해 과민화 반응을 일으킨다고 보고되었다(1-8). 또한 HBx 유전자로 형질전환 시킨 쥐에서 간암이 유발된다는 보고가 있다.

지금까지 발표된 X 단백질의 기능은 연구를 수행한 연구팀의 연구방법에 따라서 다양한 결과들을 보여준다. 즉 형질전환 동물실험에서 X 단백질이 간암을 유발시킨다는 보고와 관련이 없다는 보고들이 나오고 있으며, 세포배양을 이용한 연구에서도 연구자에 따라 cell transformation과 apoptosis를 유도한다라는 상반된 연구결과들을 보고하고 있다. 그러므로 HBV의 X 단백질의 기능을 조절하는 cellular modulator들을 규명하여 그 기전을 밝히는 것은 바이러스성 간암의 발생기전을 이해하는데 필수적이며 아울러 새로운 간암의 예방과 치료법을 개발하는데 중요한 분야임이 자명하다.

그러므로 본 연구는 레트로바이러스 cDNA 발현 라이브러리 시스템 및 cDNA array 기술을 이용하여 HBx 단백질에 의한 인체 간세포의 세포사멸에 관련된 세포유전자를 발굴 및 규명을 목표로 수행되었다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 국내·외 타 연구기관

(on anti-apoptotic function of HBx)

- 대부분 B형 바이러스성 간암 환자에서 HBx가 검출됨을 확인 (HBx 이외의 HBV 단백질들이 검출되지 않아도)
- HBx는 강력한 transcription activator인 NF- κ B를 활성화시킨다는 사실을 밝힘
- p53 단백질이 세포질에서 HBx에 의해 sequestration 된다는 사실이 밝혀짐
- HBx의 과발현은 세포수준과 실험동물에서 cell transformation을 유발한다는 사실이 관찰된 바 있음

(on pro-apoptotic function of HBx)

- HBx는 p53-dependent 및 p53-independent mode로 apoptosis를 유도할 수 있다는 사실이 보고되었음
- HBx는 간세포의 apoptosis도 serum starvation 등에 의해 sensitization 된다는 사실이 관찰되었음
- Hx의 transactivation domain 만으로도 primary rat embryo fibroblast 세포의 apoptosis가 유도된다는 사실이 관찰되었음
- HBx는 Chang liver cell에서 TNF- α /MEKK1 pathway를 통하여 apoptosis를 sensitization 시킨다는 사실이 보고되었음

위에서 언급한 바와 같이 HBx에 의한 anti-apoptosis 및 pro-apoptosis에 관한 많은 연구결과들이 보고되고 있지만 아직 molecular level에서는 mechanism은 규명되지 못하고 있다.

○ 당해 연구기관

- 국내 최초로 한국형 B형 간염바이러스의 유전체를 클로닝 하였으며 분자생물학적 기법을 이용하여 subtype을 규명하였음.
- HBx의 pro-apoptotic function이 ROS의 증가로 일어난다는 사실을 최초로 규명하였으며, 이 현상을 이용하여 HBx에 의한 간세포의 사멸을 억제할 수 있는 항산화제 및 항산화 유전자를 탐색 발굴할 수 있는 시스템을 구축하여 특허출원 완료하였음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

3.1. HBx 단백질을 발현하는 간 세포주의 완전한 세포사멸 조건 확립

3.1.1. NF- κ B의 활성 억제제와 활성산소 유도제를 동시에 이용한 방법

본 연구에서는 NF- κ B의 활성 억제제인 설파살라진과 활성 산소 유도제인 메나다이온 및 을 사용하여 인체 간세포를 완전한 세포사멸로 이르는 조건을 확립하였다. 이 때 사용한 인체 간세포는 HBx 단백질을 영구적으로 발현하는 Chang X31과 HBx 유전자를 포함하지 않는 벡터만 도입된 대조 세포주 Chang V9을 사용하였다 (그림 1).

각 세포주의 성장속도 차이를 감안하여 6-웰 플레이트에 Chang X31 세포주는 1×10^5 개, Chang V9 세포주는 0.8×10^5 개의 세포를 각각 접종하였다. 단기간에 거친 세포사멸 조건을 확립하기 위하여 세포접종 48시간 후 세포밀도가 60%정도 되었을 때 5, 10, 15 μ M의 메나다이온 (Sigma사, 미국) 및 0.1, 0.5, 1mM의 설파살라진(Sigma사, 미국)을 동시에 처리한 뒤, 24시간 후에 세포사멸 현상을 관찰하였다.

그 결과, 10 μ M 메나다이온 및 1mM 설파살라진을 동시에 처리한 실험군에서 Chang V9 세포주의 세포사멸은 유도되지 않는 반면 Chang X31 세포주는 100% 세포사멸이 유도되는 것을 관찰하였다 (그림 2). 장시간에 거친 세포사멸 조건을 확립하기 위하여 세포 접종 48시간 후에 각각 7 μ M 메타다이온 및 1mM 설파살라진, 및 10 μ M의 메나다이온 및 1mM의 설파살라진을 동시에 첨가하고, 이 후 48시간 간격으로 새 약물 배양액으로 교환해 주면서 세포 변화를 지속적으로 관찰하였다.

그 결과, 10 μ M의 메나다이온 및 1mM의 설파살라진을 처리한 실험군의 Chang X31 세포주에서 약 24시간 후 100% 세포사멸이 유도되었고, 약 120시간 후 Chang V9 세포주에서도 50% 이상의 세포사멸 현상이 관찰되었다 (그림 3). 반면, 7 μ M의 메나다이온 및 1mM의 설파살라진을 처리한 실험군의 Chang X31 세포주에서는 48시간 후 세포사멸이 약 5 내지 10%로 관찰되다가, 96시간 후에 세포의 형태학적 모양 변화가 관찰되면서 세포사멸이 약 10 내지 20%로 점차 증가되었으며, 완전한 세포사멸이 유도되기까지는 약 120시간이 소요되었고, Chang V9 세포주의 세포사멸 현상은 관찰되지 않았다 (그림 3). 따라서, Chang X31 세포주에서 단기간(24시간 이내)에 세포사멸을 유도하기 위해서는 10 μ M 메나다이온 및 1mM 설파살라진을 처리하고, 장시간(120시간 이상)에 걸쳐 세포사멸을 유도하기 위해서는 7 μ M 메나다이온 및 1mM 설파살라진을 처리하는 세포사멸 조건을 확립하였다.

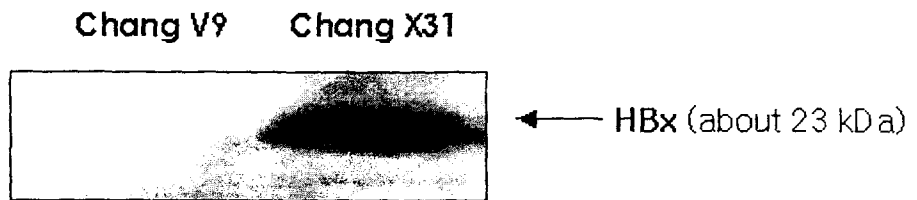
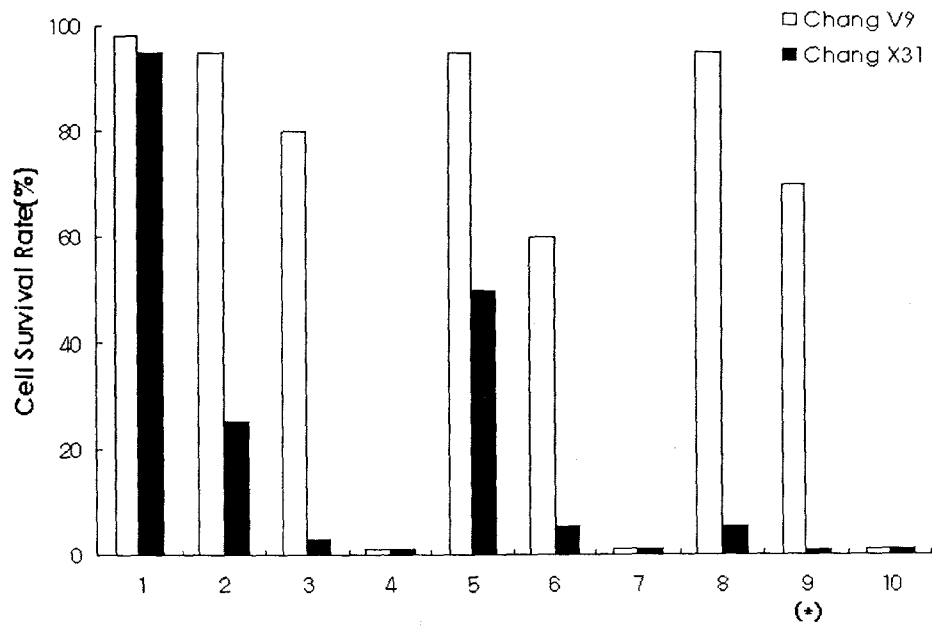


그림 1. Western blot analysis of Chang V9 and Chang X31 cell lines with anti-HBx antibody.



1. No treatment
2. Sulfasalazine 0.1 mM / Menadione 5 μ M
3. Sulfasalazine 0.1 mM / Menadione 10 μ M
4. Sulfasalazine 0.1 mM / Menadione 15 μ M
5. Sulfasalazine 0.5 mM / Menadione 5 μ M
6. Sulfasalazine 0.5 mM / Menadione 10 μ M
7. Sulfasalazine 0.5 mM / Menadione 15 μ M
8. Sulfasalazine 1 mM / Menadione 5 μ M
9. Sulfasalazine 1 mM / Menadione 10 μ M
10. Sulfasalazine 1 mM / Menadione 15 μ M

그림 2. NF- κ B 저해제와 ROS 유도제를 이용한 인체 간세포의 완전한 사멸 조건 확립.

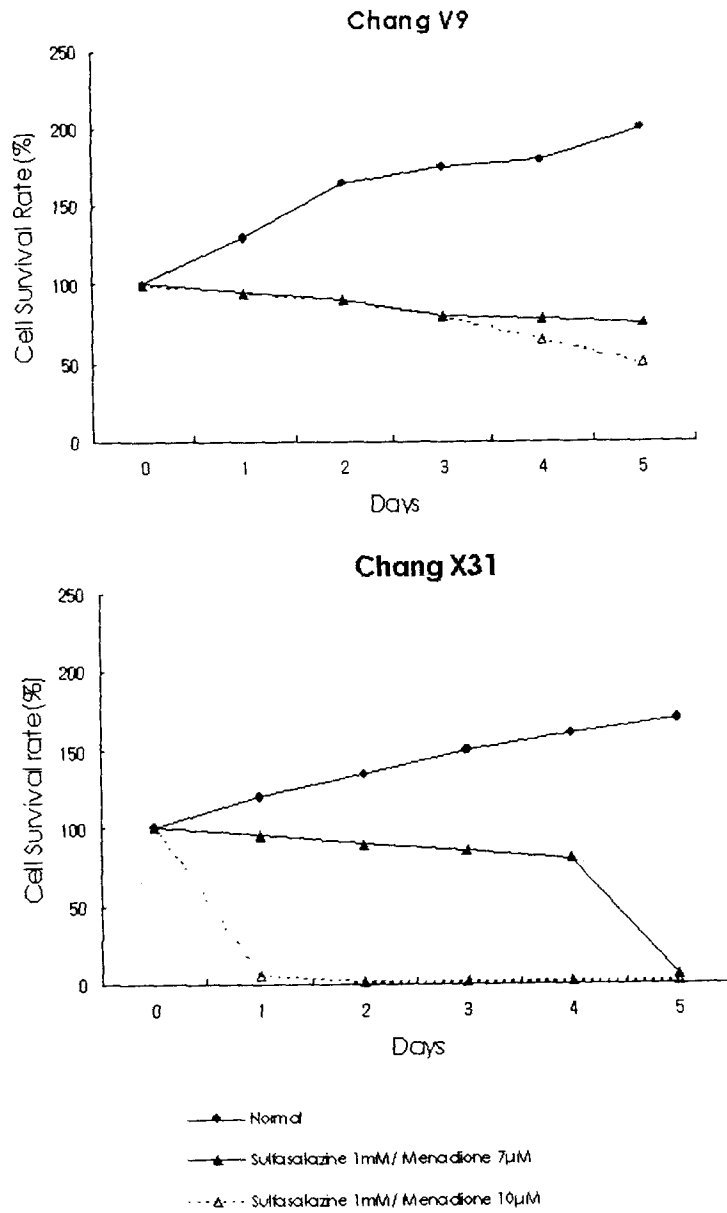


그림 3. NF- κ B 저해제와 ROS 유도제를 장기간 처리하는 인체 간세포의 완전한 사멸조건 확립

3.1.2. NF- κ B의 활성 억제제 단독으로 이용한 방법

본 연구에서는 NF- κ B의 활성 억제제인 설파살라진을 단독으로 처리하여 TNF- α 에 의한 세포생존경로를 차단함으로써 HBx 단백질을 발현하는 인간 간세포주의 완전한 세포사멸 조건을 확립하였다.

Chang X31 세포주와 Chang V9 세포주의 성장속도 차이를 감안하여 1×10^5 개, 0.8×10^5 개를 각각 6-웰 플레이트에 접종하고 세포 밀도가 60%정도로 성장한 접종 48시간째에 1.0mM, 1.3mM, 1.5mM, 1.7mM, 2.0mM 농도의 설파살라진을 각각 첨가하였다. 설파살라진처리 48시간째에 새로운 배지로 교환하면서 동일 농도의 설파살라진을 재첨가하였다. 설파살라진 재첨가 3일 후 세포사멸 관찰결과 1.0mM 설파살라진 처리군에서는 Chang V9 과 더불어 Chang X31 에서도 세포가 50% 이상으로 생존하였으며, 1.3mM 설파살라진을 처리한 실험군에서 Chang V9 세포주의 세포사멸은 유도되지 않고 Chang X31 세포주에서만 100% 세포사멸이 유도되는 것이 관찰 되었다. 1.5mM 농도 처리군에서부터는 대조군인 Chang V9 세포주에서도 설파살라진에 의한 세포사멸이 관찰되었다(그림 4).

3.1.3. 인간 간 세포주(Chang X31)의 완전한 세포사멸의 형태학적 확인

HBx 발현 인간 간 세포주(Chang X31)의 세포사멸을 형태학적으로 확인하기 위한 방법으로 세포핵 관찰이 가능한 DAPI 염색을 수행하였다. Chang X31과 Chang V9 세포주를 각각 6-웰 플레이트에 접종하고 48시간 후 단시간에 세포사멸을 유도할 수 있는 조건인 10 μ M 메나디온 및 1mM 설파살라진을 처리하였다. 24시간 후에 세포를 고정액(1% 포르말데히드, 0.2% 글루타르알데히드)에 5분간 방치한 후 인산 완충 용액으로 2회 세척하고 인산 완충 용액에 1mg/ml로 희석된 DAPI 염색액(Sigma사, 미국)을 첨가하였다. 이 후 세포는 암실상태를 유지시켜 주면서 실온에서 5시간 동안 DAPI 염색을 진행하였다. 형광 현미경을 통해 세포핵의 DAPI 염색 관찰 결과 Chang V9 세포주에서와 달리 Chang X31에서만 세포사멸시 전형적으로 관찰되는 세포핵 응축, 쪼그라듐, 알알이 깨짐 (fragmentation) 현상이 관찰되었다(그림 5).

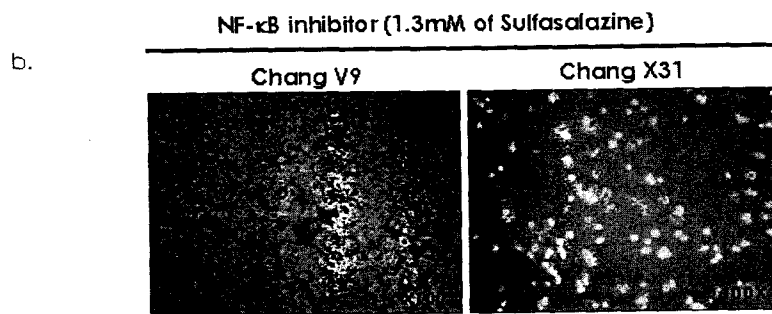
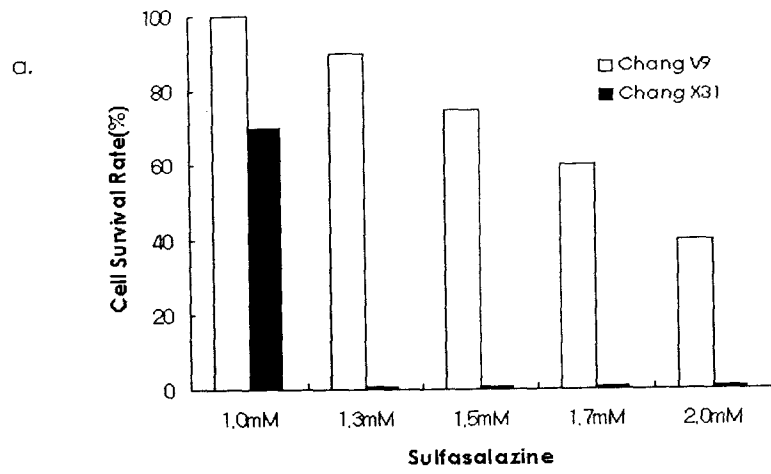


그림 4. NF- κ B 저해제를 이용한 인체 간세포의 완전한 사멸조건 확립

1.0mM of Sulfasalazine and 10 μ M of Menadione

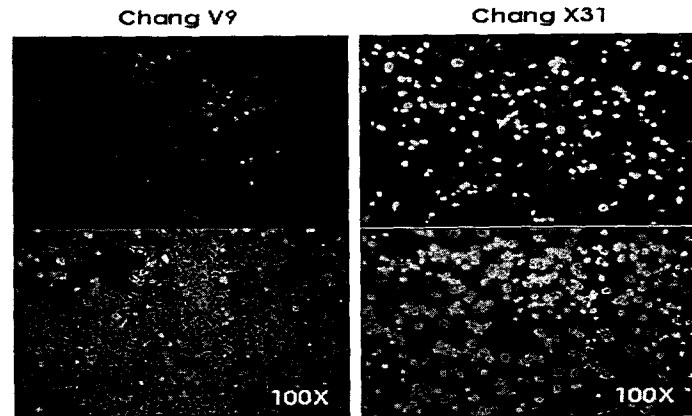


그림 5. DAPI 염색을 이용한 인체 간세포의 세포사멸 현상의 관찰

3.2. 레트로바이러스 cDNA 발현 라이브러리의 제조 및 HBx 매개 인체간세포 세포사멸 억제 유전자 탐색

library 제작 시 필요한 independent clone의 수를 줄이기 위한 새로운 cDNA normalization 방법을 고안하였다. 간세포에서 mRNA를 분리한 후 cDNA를 만들고 이를 PCR을 통해 증폭 및 biotinylation 시킨 후 denaturation과 renaturation을 통해 쉽게 renaturation 되는 abundant 한 유전자들을 제거함으로써 cDNA normalization을 유도하였다. normalization cycle 수행 후 cDNA에서의 abundant 한 유전자들의 양은 감소하고 low copy 유전자의 양은 증가되는 경향으로 검사하여 normalization이 성공적으로 진행됨을 확인하였다 (그림 6). Chang X31 세포주의 사멸을 억제하는 유전자를 탐색하는 데에 레트로바이러스 cDNA 라이브러리 벡터를 이용할 수 있는지 확인하기 위하여 레트로바이러스 라이브러리의 역할을 조사하였다. 이를 위하여 lacZ 유전자를 발현하는 리포터 레트로바이러스 벡터인 MFG/lacZ/puro(Oh et al., *Mol. Cells* 11(2), 192-197, 2001, 한양대 의대 미생물학교실 정희용 박사로부터 입수)를 이용하여 다음과 같은 예를 실시하였다. 6-웰 플레이트에 레트로바이러스 포장 세포주 GP293 세포(clontech사, 미국) 8×10^5 개를 접종한 후, 24시간 후 리포펙타민 플러스(lipofectamine Plus, invitrogen사, 미국)를 사용하여 MFG/LacZ/puro $0.5 \mu\text{g}$ 과 소포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus, VSV)의 외피 당단백질 발현벡터(pHCMV-G)(Aiken C., *J. Virol.* 71(8), 5871-5877, 1997) $0.5 \mu\text{g}$ 을 형질도입시켰다. 형질도입 48시간 후에 바이러스가 포함된 세포 배양액을 수거하여, 하루 전에 2×10^5 개 접종한 Chang X31 세포주에 감염시켰다. 37°C 에서 48시간 배양한 후, lacZ 유전자가 감염된 Chang X31 세포를 고정액(1% 포름알데히드, 0.2% 글루타르알데히드)으로 5분간 고정시키고 인산 완충 용액으로 2회 세척하여 고정액을 제거한 후, 염색액(4mM potassium ferrocyanide, 2mM 염화마그네슘, 0.625mg/ml X-gal)을 첨가하여 15시간 동안 X-gal염색을 수행하였다. 레트로바이러스 라이브러리의 Chang X31 세포주에 대한 역할은 필드(field)가 그려진 플레이트에서 한 필드에 베타-갈락토시다제(β -galactosidase)에 염색된 세포수를 센 후, 전체 lacZ 유전자의 감염된 세포수를 결정하였다. Chang X31 세포주를 대상 세포주로 사용할 때 $2.4 \times 10^4 \text{cfu/ml}$ 이상 역가의 재조합 레트로바이러스가 감염됨을 확인하였다. 이렇게 제조된 레트로바이러스를 사용하여 약 2×10^7 개의 라이브러리를 탐색한 결과, HBx-mediated apoptosis로부터 벗어난 10개의 colony를 cloning 하였다 (그림 7). 이 세포 클론들을 증폭배양시킨 뒤, PCR 및 Southern blot을 이용하여 염색체에 삽입된 레트로바이러스 proviral DNA를 회수하고자 하였다. 그러나 10개의 클론 모두 cDNA를 발현시키기 위해 사용된 레트로바이러스의 provirus를 포함하지 않는 revertant로 확인되었다 (그림 7).

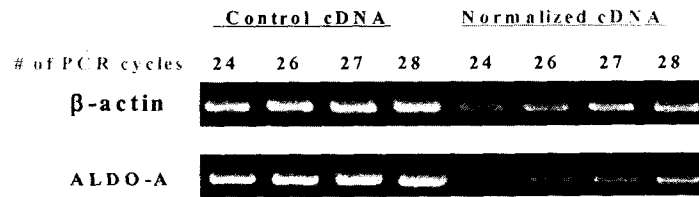


그림 6. Normalized cDNA 합성

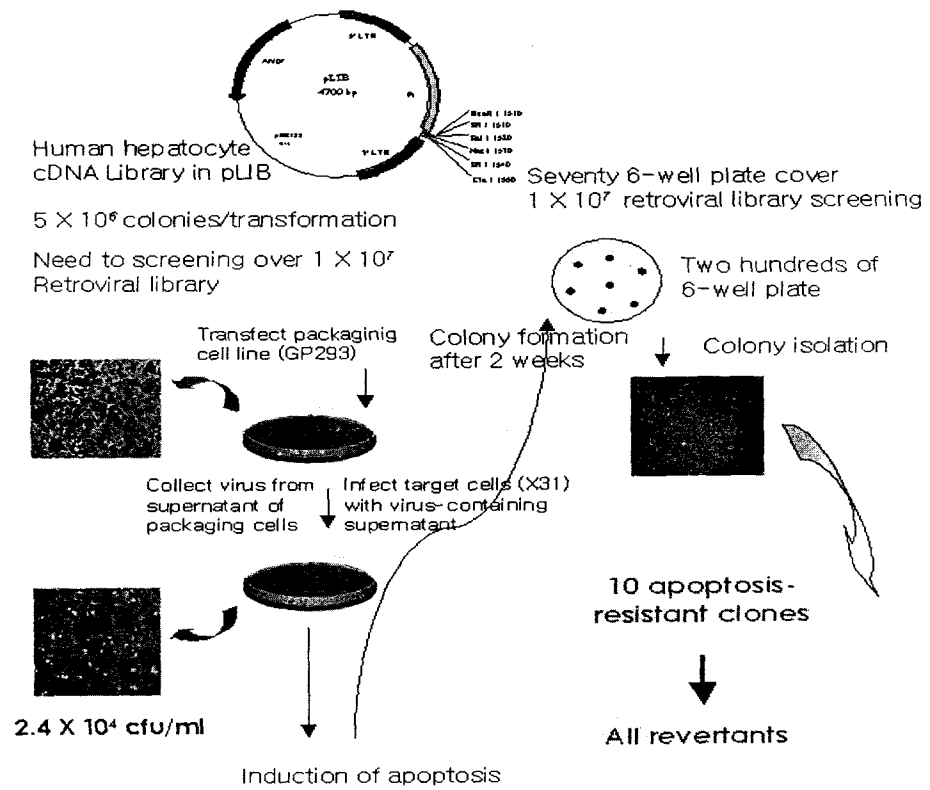


그림 7. Screening for HBx-expressing clones resistant to HBx-mediated apoptosis

3.3. HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질의 탐색

위에서 언급한 연구의 결과를 토대로 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 세포사멸에 이르게 하는 주원인이 세포 내 활성 산소라 유추하고 이에 항산화제를 처리하여 세포사멸 현상이 억제되는지 여부를 관찰하고자 다음과 같은 예를 실시하였다. Chang X31 세포 1×10^5 개를 6-well 플레이트에 접종하고 48시간째에 항산화제인 글루타티온 (Glutathione, GSH)(Sigma사, 국) 2mM 처리군, NAC (N-아세틸-L-시스테인)(Sigma사, 미국) 1mM 처리군, 항산화제를 처리하지 않은 실험군과 단백질 합성 억제제인 스타우로스포린(Staurosporine)(Sigma사, 미국) 0.5mM를 처리한 실험군의 대조군으로 나누어 간세포의 완전한 세포사멸을 유도할 수 있는 1.3mM의 설파살라진을 위에서 수행한 실험과 동일한 방법으로 처리하였다. 그 결과, 항산화제를 처리하지 않은 실험군과 단백질 합성억제제를 처리한 대조군에서는 100% 세포사멸이 관찰된 반면, 글루타티온 및 NAC를 처리한 실험군에서는 세포사멸이 부분적으로 억제되어 세포 콜로니가 형성되는 것이 관찰되었다. 형성된 세포콜로니에 대해 0.5% 크리스탈 바이올렛(소화화학, 동경, 일본)으로 콜로니 염색을 수행하여 콜로니 형성정도를 확인하였다(그림 8). 이를 통해 글루타티온 및 NAC와 같은 항산화제는 간 세포주의 세포사멸을 억제하는 활성을 가지나, 스타우로스포린과 같은 단백질 합성 억제제는 세포사멸을 억제하는 활성을 가지지 않음을 확인하였다. 즉, HBx를 발현하는 간세포주의 세포사멸은 세포 내 활성산소로부터 기인함을 재확인할 수 있었다.

3.4. 항산화 유전자 도입에 의한 간 세포주의 세포사멸 억제 관찰

Chang X31을 6-웰 플레이트에 1.5×10^5 세포수로 접종하고 24시간 후 항산화 유전자를 포유동물세포 내에서 발현할 수 있도록 클로닝 한 글루타티온 페록시다아제 GPx 발현 벡터 (pCNS-GPx:프론티어 인간유전체 사업단으로부터 입수), 페록시레독신 II (Prx II) 발현벡터 (pCMV/myc/cyto-Prx II: Kang et al., J. Biol. Chem. 273, 6297-6302(1998)), 페록시레독신 III (Prx III) 발현벡터 (pCMV/myc/cyto-Prx III: Kang et al., J. Biol. Chem. 273, 6297-6302(1998)) 및 항산화 유전자를 발현하지 않는 대조 벡터 pMYK-eGFP 를 각각 2 μ g씩 Exogene 500 (MBI Fermentus 사, 미국)을 이용하여 형질도입 하였다. 유전자도입 36시간 후에 실시예 1에서와 동일한 방법으로 설파살라진 1.3mM을 처리하여 유도된 세포사멸 조건을 극복할수 있는지 여부를 확인하고자 하였다. 약물 재첨가 3일 후 세포관찰 결과, 항산화 유전자를 도입하지 않은 대조군의 경우 100% 세포사멸이 관찰된 반면, 항산화 유전자를 도입한 실험군들에서는 세포사멸이 부분적으로 억제되어 세포콜로니가 형성되고 있는 것이 관찰되었다. 형성된 세포콜로니에 대해 0.5% 크리스탈 바이올렛(소화화학, 동경, 일본)으로 콜로니 염색을 수행하여 콜로니 형성정도를 확인하였다(그림 9).

NF- κ B inhibitor (1.3mM of Sulfasalazine)

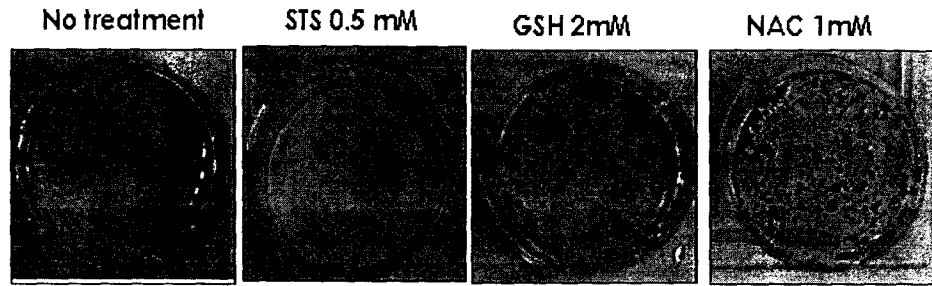


그림 8. 항산화제에 의한 HBx 매개 세포사멸의 보호작용

NF- κ B inhibitor (1.3mM of Sulfasalazine)

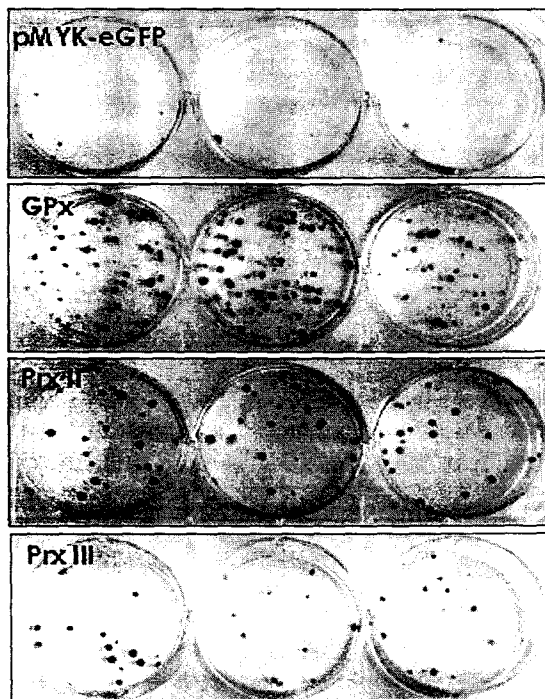


그림 9. 항산화 유전자 도입 및 발현에 의한 HBx 매개 세포사멸의 보호작용

페록시레독신 II 유전자가 도입되어 세포사멸을 억제하는 세포군에서는 페록시레독신 II 단백질이 과발현 되는 것을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(그림 10). 이러한 결과는 대조군에 비해 항산화 유전자를 도입한 실험군들에서 세포콜로니가 형성되는 결과는 항산화 유전자 (GPx, Prx II, 및 Prx III)의 과발현에 의해 HBx를 발현하는 Chang X31 간세포주의 세포사멸이 억제 될 수 있음을 의미하며, 또한 HBx를 발현하는 간세포주의 세포사멸은 세포 내 활성산소로부터 기인함을 뒷받침한다.

3.5. HBx 발현에 의해 differentially expression되는 인체 간세포 유전자 발굴

HBx를 발현하는 세포주 (chang X31)의 경우, NF- κ B 억제제인 sulfasalazine 1.3mM에 의해 완전한 세포사멸로 이르는 반면 HBx를 발현하지 않는 세포주 (chang V9)는 세포사멸이 일어나지 않고 있다. 정상 세포주에 HBx 발현으로 어떤 유전자들의 발현이 변화되어 sulfasalazine에 대한 sensitivity가 증가하는지 확인할 필요가 있었다. 이에 chang V9과 chang X31의 RNA를 이용하여 cDNA array를 수행하였다. Chang V9과 chang X31 세포주를 100 f dish에 1×10^6 으로 split 한 뒤, 48시간이 지난후에 세포를 harvest하여 RNeasy Midi kit (Qiagen 사)를 이용하여 RNA를 preparation 하였다. RNA purity는 Formaldehyde RNA gel에 RNA를 running한 후, EtBr staining으로 확인하였다. 준비된 RNA를 이용한 cDNA array 실험은 인간 유전체 사업단에 의뢰하였다. DNA chip은 인간 유전체 사업단에서 제작된 위암 관련 유전자로 구성된 14K chip을 사용하였다. 실험에 사용된 RNA는 독립적으로 2번 이상 preparation 하였고, 각각의 준비된 RNA를 이용하여 최소 2번 이상 array를 수행하였다. Chang V9과 chang X31 RNA를 이용한 cDNA array 결과, chang X31에서 유의성있게 up-regulation (46 genes) 되거나, down-regulation(20 genes) 된 유전자들을 정리하였다 (Table 1).

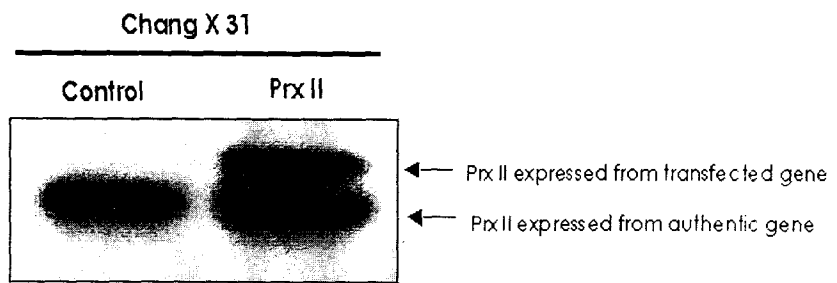


그림 10. 웨스턴 블롯팅 방법을 사용한 PrxII 발현 벡터 도입에 의한 Chang X31 세포에서의 PrxII 단백질의 과발현 확인

Table1 a. Up-regulated genes

Gene	Description	NCBI unigene#	exp1	exp2	exp3	exp4
GP1P1	glutathione S-transferase pi	Hs. 226795	17.5	18.5	25.6	17.2
MT2A	metallothionein 2A	Hs. 118786	9.8	7.6	18.9	16.0
ANXA2	annexin A2	Hs. 217495	4.0	4.5	3.7	3.4
NMT2	N-myrystoyltransferase 2	Hs. 122647	4.9	3.2	3.4	3.7
PP1B	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	Hs. 699	3.5	3.7	4.3	3.0
KRT19	keratin 19	Hs. 182265	2.8	3.0	3.1	2.7
GPR56	G protein-coupled receptor 56	Hs. 6527	7.4	5.6	3.0	3.6
CLU	clusterin	Hs. 75106	2.8	3.2	4.0	2.8
P8	p8 protein (candidate of metastasis 1)	Hs. 8603	3.0	2.9	4.0	6.0
RNF10	ring finger protein 10	Hs. 5094	3.0	3.9	2.6	2.8
PSK-1	type 1 transmembrane receptor	Hs. 6314	3.4	3.9	2.4	3.0
FLJ12443	hypothetical protein FLJ12443	Hs.179882	4.2	2.8	9.8	4.2
DSTN	destrin(actin depolymerizing factor)	Hs. 82306	2.4	2.3	2.8	2.6
HSPC182	HSPC182 protein	Hs. 30026	2.8	2.4	2.6	2.3
B2M	beta -2-microglobulin	Hs.75415	2.3	2.6	2.4	2.8
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	Hs. 77326	5.6	2.3	3.0	4.9
HK1	hexokinase 1	Hs. 118625	7.1	2.3	3.8	3.7
ENGMA	enigma(LIM domain protein)	Hs. 102948	5.1	3.4	4.2	2.1
RAI3	retinoic acid induced 3	Hs. 194691	2.6	2.8	3.1	2.1
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	Hs. 306098	3.8	2.8	2.2	6.7
ADRM1	adhesion regulating molecule 1	Hs. 90107	3.2	2.2	2.5	2.2
C5orf7	chromosome 5 open reading frame 7	Hs. 24125	2.6	3.3	2.1	2.2
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	Hs. 182018	2.0	2.9	2.2	2.5
MAPRE1	microtule-associated protein	Hs. 234279	2.5	1.9	4.3	2.9
CLIC1	chloride intracellular channel 1	Hs. 74276	2.0	2.0	2.0	2.1
GOLPH5	golgi phosphoprotein 5	Hs. 4291	2.5	1.9	2.2	2.1
VATI	vesicle amine transport protein 1	Hs. 157236	1.9	2.1	3.0	2.7
SLC28A3	solute carrier family 28	Hs. 306216	5.6	2.0	3.2	2.4
CLDN18	claudin 18	Hs. 278966	2.1	4.6	9.8	2.3
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Hs. 93002	1.7	2.7	5.2	3.4
LOC51234	ypothetical protein LOC51234	Hs. 250905	2.8	2.1	1.8	2.8
SPTAN1	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1(alpha-fodrin)	Hs. 77196	3.4	2.4	1.9	2.1

Table1 b. down-regulated genes

Gene	Description	NCBI unigene#	exp1	exp2	exp3	exp4
P450	P450(cytochrome) oxidoreductase	Hs. 167246	-4.9	-4.0	-4.9	
PSME1	proteasome activator subunit 1(PA28 alpha)	Hs. 75348	-3.2	-2.8	-3.2	
PGM1	phophoglucomutase 1	Hs. 1869	-3.0	-3.0	-3.0	
ZNF76	zinc finger protein 76	Hs. 29222	-3.0	-2.3	-3.4	
FBLN2	fibulin 2	Hs. 198862	-4.6	-3.9	-2.8	
TUBA1	tubulin, alpha 1(testis specific)	Hs. 75318	-2.4	-2.2	-2.4	
PGM1	phosphoglucomutase 1	Hs. 1869	-3.7	-2.6	-2.8	
MGMT	microsomal glutathione S-transferase 3	Hs. 111811	-3.1	-2.8	-3.9	
MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog(mouse)	Hs. 20725	-3.2	-2.3	-2.4	
CKMT1B	creatine kinase, mitochondrial 1 (ubiquitous)	Hs. 153998	-2.2	-2.6	-2.7	
CHN2	chimerin (chimerin) 2	Hs. 286055	-2.2	-2.4	-2.1	
P100	EBNA-2 co-activator (100kD)	Hs. 79093	-2.6	-5.2	-2.4	
RXRA	retinoid X receptor, alpha	Hs. 20084	-2.0	-2.6	-2.8	
RPS10	ribosomal protein S10	Hs. 76230	-2.6	-3.0	-2.1	
FLJ23091	hypothetical protien FLJ23091	Hs. 250746	-2.0	-2.4	-2.1	
UBE2E1	ubiquitin-conjugatin enzyme E2E 1	Hs. 7766	-2.4	-2.1	-2.1	
RABGGTB	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	Hs. 78948	-3.7	-2.0	-2.3	
CABC1	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like	Hs. 273186	-2.4	-2.3	-3.2	
SGK	serum/gluccorticoid rugulated kinase	Hs. 296326	-3.0	-1.8	-3.2	
PMLP	plasmolipin	Hs. 12701	-3.0	-2.4	-1.8	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연차별 목표	평가의 착안점	자 체 평 가
1차년도 : Retroviral cDNA expression library system 확립	titer 1.0×10^4 cfu/ml 이상의 retroviral cDNA expression library 제조	성공적으로 완료됨. 차후 유전자발현을 이용한 스크리닝 및 기능 유전체학 연구에 이용할 수 있음
2차년도 : Retroviral cDNA expression library system 확립	HBV X-induced apoptosis 조건 확립	성공적으로 완료됨. 본 시스템을 간암 유발 후보유전자들을 검증하는데 이용할 수 있음.
	100만개 이상 retroviral transduced cell의 screening	500만개 retroviral transduced cell을 screening 완료
	HBV X-induced apoptosis로부터 protection된 세포주클론 10개 이상 확보	성공적으로 완료되었으나 모두 revertant 인 것으로 판명됨
3차년도 : HBV X 단백질에 의한 세포사멸을 protection 하는 세포단백질 발현 유전자 3종 발굴	HBV X 단백 질에 의한 세 포 사 멸 을 protection 하 는 세포단백질 발현 유전자 3 종 발굴	GPx, PrxII, PrxIII와 같은 ROS 관련 유전자의 과발현이 HBx-mediated apoptosis를 억제할 수 있다는 사실을 밝힘으로써 감염 및 감염의 유발 원인 중 하나가 ROS 라는 사실을 입증함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

HBx 발현에 의한 ROS 발생기전에 관여하는 세포단백질들의 상호 네트워크 및 동력학적 변화를 조사 분석하여 세포시스템에서의 HBx-mediated apoptosis 및 transformation 기전을 규명하는 연구 모델로 활용 중 (2003년 과기부 시스템생물학 특정연구사업)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 참고문헌

1. Ginis, I., et al., Tumor necrosis factor and reactive oxygen species cooperative cytotoxicity is mediated via inhibition of NF-kappaB. *Mol Med*, 2000. 6(12): p. 1028-41.
2. Kim, H., H. Lee, and Y. Yun, X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem*, 1998. 273(1): p. 381-5.
3. Milligan, S.A. and C. Nopajaroonsri, Inhibition of NF-kappa B with proteasome inhibitors enhances apoptosis in human lung adenocarcinoma cells in vitro. *Anticancer Res*, 2001. 21(1A): p. 39-44.
4. Osawa, Y., et al., Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine- induced sensitization against tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte apoptosis. *J Cell Physiol*, 2001. 187(3): p. 374-85.
5. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*, 1999. 19(6): p. 350-64.
6. Pollicino, T., et al., Pro-apoptotic effect of the hepatitis B virus X gene. *Biomed Pharmacother*, 1998. 52(9): p. 363-8.
7. Su, F. and R.J. Schneider, Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(16): p. 8744-9.
8. Wu, W.S., et al., PML sensitizes TNFa-induced apoptosis by inhibiting the NF-kappa B survival pathway. *J Biol Chem*, 2003. 22: p. 22.

제 4 부

B형 간염 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석에 관한 연구

주관연구기관 : 한국생명공학연구원

연구책임자 : 이 영 익

연구원 : 최 홍 석
장 근 영
손 진 경

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구 개발의 목적

HBV-X 결합 단백질의 발굴과 기능 분석, Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴 세포 주기변이 관련 유전자군의 발굴 및 기능 분석을 통하여 B형 간염 바이러스성 간암 생성 기작을 밝히고자 하였다.

2. 연구 개발의 필요성 및 범위

HBV-X 단백질(HBx)이 간암 발생의 직접적인 원인(Kim et al., Nature, 351: 317-320, 1991)으로 밝혀진 이후 HBx가 여러 유전자들을 활성화시킴으로써 암을 일으킨다는 연구가 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고, 아직도 B형 간염바이러스에 의한 발암 기전은 명확하지 않은 상태이다. 따라서 B형 간염 바이러스의 주요 산물인 HBx 단백질에 관련된 신규 유전자를 발굴, 분리하여 이들의 기능 분석을 통해 간암의 발병기전을 이해하고자 하였다. B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성과 관련하여 HBV가 S/preS, C/preC와 HBx 단백질을 encode함은 잘 알려져 있다. 이중 HBx 단백질은 간암 생성에 중요한 인자로 인식되고 있고 이 단백질에 의한 전사 활성이 중요한 작용임이 밝혀지고 있다. 특히 HBx 단백질은 세포질 내에 존재하고 있다가 핵내로 이동하여 다른 유전자들의 전사 활성을 조절하는데, 이와 관련된 결합 단백질의 발견이 B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성 기작을 밝히는 핵심이 될 것으로 보고되어 왔다. 이에 본 연구에서는 B형 간염 바이러스의 주요 산물인 HBx 단백질에 관련된 신규 유전자를 발굴, 분리하여 이들의 기능 분석을 통해 간암의 발병기전을 이해하고자 하였다. 이를 위하여 Yeast two hybrid system을 이용하여 HBx 단백질과 결합하는 신규 유전자를 human fetal liver cDNA library로부터 탐색하였고, DD-PCR analysis, promoter binding assays 등을 수행하였다. 그 결과 HBx에 의해 영향을 받는 여러 유전자들을 분리하는데 성공하였고, 본 연구는 이들 HBx 관련 신규 유전자들을 transcriptional acetylation에 관련된 유전자, mitochondrial physiology와 관련된 유전자, 그리고 HBx promoter에 결합하는 유전자 등 크게 세 그룹으로 구분하고, 각각 HBx 단백질과 관련하여 functional study를 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성 기작에 관한 연구 분야

B형 간염바이러스는 hepadnavirus family의 prototypic virus로서 바이러스 particle속에는 HBV의 유전자인 매우 특이한 구조의 약 3.2kb의 partial duplex circular genome을 갖고 있다. HBV는 DNA virus 이면서 RNA로 복제하는 매우 복잡하며 특이한 유전자 복제기전을 가지고 있다. HBV는 네 개의 단백질 (i.e., core, DNA polymerase, HBsAg, X)을 encode하며, 그중에서 X단백질이 암 발생과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

HBx 단백질의 생화학적 활성 중에서 가장 잘 연구된 기능은 transcriptional transactivator로서의 HBx 단백질의 기능이다. 핵과 세포질에 존재하는 HBV-X 단백질은 DNA에 직접 결합하지는 않지만 RNA polymerase II의 전사인자인 AP-1, AP-2, NF- κ B, TFIIIC 등을 활성화시키며 p53과 같은 tumor suppressor와 직접 결합하거나 RNA polymerase II의 구조체인 RPB5나 CREB/ATF2, TATA 결합 단백질 (TBP)과 protein-protein interaction으로 유전자 발현에 관여한다. 최근에는 HBV-X 단백질이 간세포 신호전달체계 직접적으로 작용한다는 연구 결과도 보고되고 있다. X-단백질이 PKC dependent pathway와 ras -MAP kinase pathway를 활성화시킴으로써 유전자의 발현을 증가시킨다는 것이다.

이와 같이 국내외적으로 HBV에 대한 연구는 광범위하게 이루어지고 있으며, 특히 HBV-X 단백질이 간암 발생의 직접적인 원인으로 밝혀진 이후 (Kim et al., Nature, 351: 317-320, 1991) HBV-X 단백질에 관한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 그러나 현재까지 HBx가 여러 유전자들을 활성화시킴으로써 암을 일으킨다는 연구가 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고, 아직도 B형 간염바이러스에 의한 발암 기전은 명확하지 않은 상태이다.

2. B형 간염 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 분야

B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성과 관련하여 HBV가 S/preS, C/preC와 HBx 단백질을 encode함은 잘 알려져 있다. 이중 HBx 단백질은 간암 생성에 중요한 인자로 인식되고 있고 이 단백질에 의한 전사 활성이 중요한 작용임이 밝혀지고 있다. 특히 HBx 단백질은 세포질 내에 존재하고 있다가 핵내로 이동하여 다른 유전자들의 전사 활성을 조절하는데 이와 관련된 결합 단백질의 발견이 B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성 기작을 밝히는 핵심이 되리라 사료된다. 최근 HBV가 가지는 X 유전자에서 발현되는 X 단백질이 간세포의 신호전달 체계에 직접 작용한다고 보고되었으나, 그와 관련된 정확한 기작은 알려지지 않았다. 따라서 이러한

HBV의 간암 형성 기작에 관련된 HBx 단백질과 상호작용하는 신규 유전자의 발굴은 간암 생성 기작을 이해하는데 큰 역할을 할 것으로 기대되고 있다.

3. 바이러스성 간암 형성시 세포주기 변이 관련 유전자 발굴 분야

신호전달체계는 세포의 성장분화 및 세포의 정상적 유지에 필수적인 체계로서 이 신호전달 체계가 비정상적으로 될 때 정상세포는 비정상적으로 성장, 분화하게 되어 제거되거나 암으로 발전하기도 한다. 따라서, 국외의 경우 세포내의 신호전달체계에 관련된 여러 인자들을 찾아내고 이들의 작용 기작을 연구하여 이들이 암의 발생 기작에서 어떻게 관여하는지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. B형 간염 바이러스(HBV)는 인체에 간염, 간경변 및 간암을 유발하는 주요 인자이고, HBV가 가지는 X유전자에서 발현되는 X단백질이 간세포의 신호전달 체계에 직접적으로 작용함으로써 간암발생에 관여한다는 연구 결과들이 보고됨에 따라, 간암발생 기전 연구에서 X단백질의 역할을 규명하고 X단백질에 의해 활성화되는 세포 유전자를 탐색하는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

본 연구진은 다년간 HBV-X단백질의 구조와 기능을 규명하고자 노력해 왔다. 그 결과, X단백질의 클로닝을 통한 동물세포 및 대장균에서의 발현을 성공시켰고, 간암세포주로부터 HBV-X 단백질을 지속적으로 발현시키는 영구 발현 세포주를 확립하였다. 이 과정에서 암화된 세포 (HepG2 및 Hep3B) 로 확립했던 HepG2-X와 Hep3B-X 세포군들은 X단백질을 감염시키지 않은 세포군에 비해 세포성장 속도가 매우 느려지거나, 어떤 것들은 배양시간이 길어짐에 따라 그 viability가 점점 떨어지는 현상을 보였다. HBV-X단백질이 간세포의 세포주기 및 신호 전달 체계에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하기 위하여는 발현 벡터 및 동물세포 확립이 필수 불가결하고, 또한 간세포의 세포주기 조절 메커니즘에 대한 HBV-X의 역할을 규명하는 연구를 수행할 때 HBV-X단백질의 발현이 cyclins, cdk, p53, 그리고 RB등의 세포주기 조절인자들과 p15, p16, p21, p27등의 cdk 저해제들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하는 일이 중요하므로 이를 위한 assay system을 확립하는 일 또한 중요하다. 본 연구진은 HBV-X 단백질의 역할에 대한 다년간의 연구 경험을 바탕으로 HBV-X 단백질을 지속적으로 발현시키는 세포주로부터 HBV-X 단백질에 의해 활성화 또는 억제화되는 간암형성과 관련된 세포 유전자를 발굴하고, 이로부터 HBV-X단백질의 기능을 억제하고 궁극적으로는 간암형성을 억제시킬 수 있는 억제제를 탐색하는 것을 연구목적으로 삼고 있다.

또한 본 연구진의 다른 결과에 따르면 HBV-X 발현 플라스미드를 이용한 실험에서 HBV-X가 세포내 전사인자중 하나인 Sp1의 인산화를 촉진시킴으로써 이 인산화된 Sp1과

DNA의 결합을 증가시키고 IGF-II의 유전자의 발현을 유도한다. 이처럼 X 단백질의 발현과 IGF-II 발현사이에 밀접한 연관이 있고, 이것이 간암 발생과정의 중요한 기작으로 작용할 수 있음을 고려하여 간염을 비롯하여 간암에 이르는 간 질환 병리기전 규명의 일환으로 X 단백질이 간암형성에 관여하는 것으로 여겨지는 IGF-II 발현에 어떻게 관여하며 세포내 kinase들의 특성을 규명 함으로써 성장인자 및 바이러스에 영향을 받은 secondary messenger와 유전자의 이상조절에 의한 간암 형성 과정을 이해하고자 하였다. 세포내 신호전달에 관계하는 여러 kinases에 대한 억제제 처리 및 발현 플라스미드의 처리 결과 HBV-X 단백질은 PKC와 MAPK를 통하는 신호 전달체계와 관련되어 Sp1의 인산화를 촉진시키고 그로 인한 DNA와의 결합을 증가시켜 IGF-II 유전자의 발현을 증가시키고 IGF-II 단백질의 분비를 증가시킴을 밝혔다. 이러한 실험 model 및 세포주의 확립은 바이러스성 간암 형성시 세포주기 변이 유전자의 발굴에 커다란 기여를 할 것이다.

4. 바이러스성 간암 형성시 apoptosis/antiapoptosis 관련 유전자 발굴 분야

현재까지 apoptosis와 antiapoptosis를 조절하는 무수한 유전자가 밝혀졌다. 이에 대한 연구는 이 같은 현상의 메카니즘을 밝히고, 이와 관련된 다른 apoptotic 또는 antiapoptotic factor 발굴을 통해 연구되고 있다. 그중 주요한 apoptotic pathway는 2가지로 말할 수 있는데, 첫째 caspase cascade를 거치는 경우 caspase-8, caspase-3 등을 포함한 많은 유전자가 관련되어 caspase substrates를 절단하여 최종 apoptosis로 이끄는 경우가 있고, mitochondrial pathway를 통하는 경우 Bcl-2 family가 밀접하게 관련하여 mitochondria membrane potential 변화로 apoptosis를 일으키는 경우가 있다. 이때 Bcl-2 members에는 다양한 proapoptotic factors와 antiapoptotic factors가 이미 밝혀져 있다. 이밖에도 NF- κ B와 p53은 apoptosis를 PI3K/AKT를 통해서 antiapoptosis가 일어나고 있음이 밝혀지고, 이와 관련된 많은 유전자가 현재 알려지고, 발굴 중이다. 이러한 추세에서 HBx 단백질과 관련된 세포 사멸 현상은 지금까지 주로 p53 단백질과의 관계에서 연구되어 왔다. 여러 연구에서 HBx 단백질의 전사활성 서열에 p53 결합 서열이 있어 전사가 조절됨이 밝혀졌다. 이를 바탕으로 세포 사멸과 관련하여 HBx 단백질의 기능이 caspase 3와 결합에 의한 작용도 있음이 보고 되고 있으며 또한 HBx에 의한 NF- κ B 단백질군의 활성화도 밝혀지고 있다. 그러나 이와는 반대로 HBx에 의한 antiapoptosis 효과도 최근 제기 되고 있는 추세이다. 이와 같이 바이러스성 간암 형성에서 HBx에 의한 apoptosis/antiapoptosis 현상은 복합적인 작용에 의해 세포의 내부 환경에 따라 작동함을 의미하고 있다. 이와 같은 상황에서 명확한 HBx의 작용 규명이 절실히 요구되고 있다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

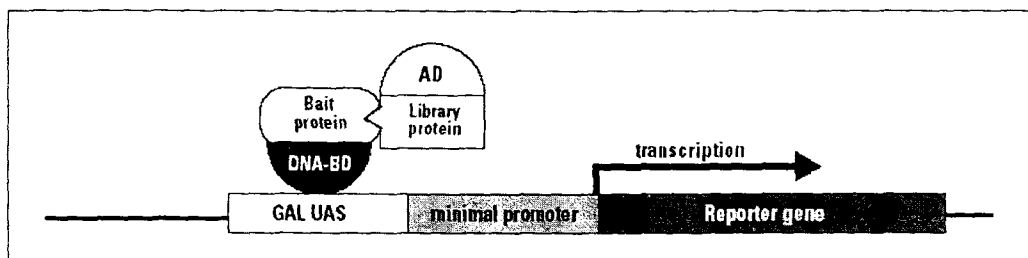
1. 연구내용 및 방법

가. B형 간염 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴

간염 바이러스(HBV)는 인체에 간염, 간 경변 및 간암을 유발하는 주요인자로, 최근 HBV가 가지는 X 유전자에서 발현되는 X 단백질이 간세포의 신호전달 체계에 직접 작용한다고 보고 되었으나, 그와 관련된 정확한 기작은 알려지지 않았다. 이러한 HBV의 간암 형성 기작에 연관된 HBx와 상호 작용하는 신규 유전자를 발굴하고, 그 기능을 분석하는 작업은 간암 억제제 및 유전자진단 치료제 개발에 토대가 될 것이라 사료된다. 바이러스성 간암 관련 유전자를 발굴하기 위해 실험실에 보유된 Human fetal liver cDNA library로부터 Yeast two hybrid system을 이용하여 HBx와 상호작용하는 신규 유전자를 발굴하고자 하였다.

1) Yeast two hybrid system

HBx와 상호작용하는 신규 유전자 탐색을 위해 본 연구진은 Clontech사의 Matchmaker GAL4 two hybrid system을 이용하였다. 이 system은 yeast의 GAL4 전사 활성 인자의 DNA-binding domain과 activation domain을 분리하여 발현되도록 하고 reporter 유전자(lacZ)의 promoter upstream에 GAL4 upstream activation sequence(UAS)가 존재한다. 이들 system을 통해서 상호 작용하는 두 단백질을 각각의 domain과 함께 발현시키게 되면 GAL4 DNA-binding domain이 DNA상에 위치하게 되고 이들과 하나의 형태로 발현된 단백질은 activation domain과 발현된 단백질과 결합하여 reporter gene인 lacZ가 발현되어 실제로 yeast 세포 내에서 두 단백질이 상호작용하고 있음을 볼 수 있게 된다.



GAL4 yeast two hybrid system의 모식도

2) 플라스미드 제작

Yeast two hybrid를 수행하기 위해 DNA binding domain을 갖는 pAS2-1 벡터에 HBx 단백질을 Pst I 과 EcoR I의 두가지 제한 효소를 이용하여 재조합 하였다. 또한 activation domain을 갖는 pACT2 벡터에 human fetal liver cDNA library를 재조합 시켜 신규유전자를 선별하였다. 본격적인 GAL4AD-library 스크리닝 실험을 진행하기 앞서 pAS2-1/HBx 재조합 플라스미드의 자가 전사 활성도를 검사하여 단독으로 reporter 유전자를 발현시키지 않음을 확인하였다.

3) Yeast의 Co-transformation

HBx 단백질과 상호 작용하는 간세포 유전자를 탐색을 위해 yeast 내에 pAS2-1/HBx와 pACT2/library 플라스미드를 co-transformation 시켰다. 먼저 3ml의 YPD배지에 yeast를 접종하여 30°C에 배양하고 이것을 밤새 배양한 후 OD₆₀₀값이 0.5 정도 되도록 준비한다. 준비된 yeast에 PEG/LiAc 용액을 이용하여 carrier DNA (single stranded salmon sperm DNA)와 2개의 플라스미드를 Heat-shock시켜 co-transformation 시킨다. 형질전환된 yeast는 선택 배지에 plating하여 4-7일 관찰하여 분리한다.

4) β -gal filter assay

His 선택 배지에 의해 분리된 yeast를 다시 LacZ 발현 유무로 분리하기 위해 콜로니가 자라 나온 plate에 β -gal filter assay를 진행한다. 먼저 깨끗한 핀셋을 이용하여 Whatman 50 원형 필터를 plate에 얹고 3 ml Z buffer, 20 μ l의 2% X-gal (DMF에 녹여 -20°C에 보관한), 8 μ l β -mercapto-ethanol을 넣어준 다음 Whatman #3 필터를 Z buffer 혼합액이 든 plate에 넣는다. 액체 질소에 5-10 초 담근 filter를 상온에서 20-60 초간 녹인 후 filter 위에 yeast가 있는 면이 위를 향하도록 핀셋을 이용하여 잘 얹고 37°C에서 콜로니가 푸른색을 띠 때까지 반응시킨다.

5) Yeast에서 plasmid DNA의 순수 분리

β -gal filter assay에서 푸른색을 띤 콜로니를 SD-Leu에 접종 하고 30°C 배양기 에서 밤새 키운다. 그것을 microfuge tube에서 원심분리 하여 yeast 현탁액을 얻은 후 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA를 넣는다. 거기에 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)을 더하고 acid-washed glass bead를 (0.45-0.52 mm glass beads, 세포 분쇄용) 넣는다. glass bead는 질산원액에 한 시간 담근 후 물로 여러 번 씻어 준 후 마르도록 굽는다. 이 혼합물을 vortexing하고 원심분리하여 상등액을 E. coli에 transformation 시킨다. 형질 전환된 E. coli로부터 플라스미드를 순수 분리하여 제한 효소를 처리 한 후 plasmid genotype을 확인한다.

6) false positive 제거

형질 전환된 yeast의 His⁺,lacZ⁺ 결과가 hybrid 단백질들간의 직접적인 결합에 의해 일어나지 않은 false positive를 제거하기 위해 순수 분리한 GAL4AD-library plasmids를 다시 yeast에 형질 전환시킨다. 이때 GAL4AD-library plasmid 단독, pAS2-1 벡터과 함께, pAS2-1/HBx와 함께 등등 각각의 GAL4AD-library plasmid당 3 종류의 yeast 형질전환을 실시 한다. 3가지 경우의 콜로니가 적당히 자라면 filter assay를 시행하고 GAL4AD-library plasmid중에서 오직 pAS2-1/HBx 와 함께 있는 경우에만 푸른색을 보이는 GAL4AD-library plasmid들만 분리하여 실험을 진행한다. 위의 실험을 거쳐 선별된 GAL4AD-library plasmid의 염기 서열을 분석하여 결정한다.

7) In vitro interaction 분석

Yeast two hybrid를 통해 HBx와 상호작용을 하는 단백질을 확인하기 위해 실제 간암세포주인 Hep3B 세포에서 각각의 단백질을 발현시킨 후 Immunoprecipitation을 시행하였다. 이를 위해 먼저 Hep3B 세포에 과발현 시킨 전체 단백질을 수거 한 다음 HBx와 HDAC1 항체를 이용하여 IP를 실행한다. IP는 10mM Tris, pH8.0, 150 mM NaCl; and 0.5 % NP-40, 1 g/ml leupeptin, 1 g/ml aprotinin, 1 mM PMSF으로 이루어진 IP 완충액에 항체와 시료 단백질을 섞어주면서 4°C에서 밤새 반응시키고 여기에 protein A plus G Sepharose bead(Santa Cruz, USA)를 반응시켜 원심분리 후 수거한다. 수거한 침전물은 IP 완충액을 이용하여 3번 씻어주고 이것을 SDS 전기영동을 수행하여 monoclonal anti-histone deacetylase (HDAC)1 (Santa Cruz)항체를 이용 western blot 하여 확인한다.

나. 세포주기 변이 관련 유전자군 발굴

HBV가 간염,간암의 주요 발생인자이고 특히 HBV가 가지는 X-유전자에서 발현되는 X단백질은 암의 발생에 주요한 인자로 알려져 있다. 이러한 HBx 단백질은 세포주기 조절과 관련하여 세포주기를 촉진시킨다는 보고도 있고 이와는 반대로 X단백질이 cell transformation과 관련하여 세포주기를 억제시킨다는 연구 결과들 또한 보고되고 있다. 이는 본 연구진에서 연구한 결과와 같이, HBV-X 단백질이 간세포 신호전달체계에 직접 관여하여 생리적 활성을 조절하고 세포주기를 변화시킴으로써 간암형성에 중요한 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 예이다. 이러한 관점에서 B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성시 세포주기의 변이 현상에 관여하는 유전자군의 발굴은 중요한 의미를 가질 수 있다. 이에 2 종류의 간암세포주 (HepG2, Hep3B)로부터 간암 형성에 깊이 관여할 것으로 여겨지는 HBV-X 단백질을 permanent하게 발현시키

는 HBV-X발현 간암세포주를 이용한 세포주기 변이 현상을 규명하고자 하였다.

1) 확보된 HBx 영구 발현 간암세포주의 검증

HBx 단백질이 영구 발현 되는 간암 세포주를 제조 한 후 제조된 세포주들에 대해 각각 southern과 northern blot을 통해 HBx의 발현 유무를 검증하였다. 먼저 HBx DNA의 삽입 유무를 검증하기 위한 southern blot은 각각의 세포주들에서 20ug의 염색체 DNA를 추출한 후 제한효소 *EcoRI* 처리하여 절단한다. 절단된 DNA는 0.8% agarose 겔에 전기영동 시킨 후 nitrocellulose paper에 transfer 시킨다. 전이된 DNA는 ³²P로 표지된 465 bp의 Sal I 절편 HBV-X DNA를 probe로 사용하여 확인한다. HBx RNA의 발현 유무를 검증하기 위한 northern blot의 경우 각각의 세포주들로부터 20ug의 RNA를 추출한 후 0.8% agarose, 2.2 M formaldehyde-denaturing 겔에 전기영동 한 후 nitrocellulose paper에 transfer하여 ³²P로 표지된 465 bp Sal I 절편 HBV-X DNA를 probe로 하여 확인한다.

2) HBx에 의한 세포주기 변이 관찰

HBx에 의한 세포 주기의 변화를 관찰하기 위하여 HBx 단백질이 영구히 발현되는 간암 세포주(Hep3B, HepG2)를 배양한 후 수거하여 Becton Dickinson FACScan flow cytometer를 이용하여 세포주기의 변이를 관찰하였다.

다. Apoptosis/anti-apoptosis 관련 유전자군 발굴 분야

HBV 바이러스에 의한 간암 관련 유전자를 발굴하기 위하여 암생성에 중요한 기작으로 알려진 세포사멸을 통한 연관성을 확인하여 이와 관련된 유전자군을 발굴하고자 계획하였다. 이를 위해 먼저 HBx 단백질이 간암세포주에서 세포사멸 과정에서 어떠한 영향을 끼치는가를 확인하고 그 작용에 관련된 유전자를 발굴하고자 하였다.

1) DD-PCR

HBx 유전자에 의해 다르게 발현되는 gene을 찾기 위해 본 연구팀은 human hepatoblastoma cell line(HepG2)과 HBV-x 유전자를 넣은 HepG2-4x 세포주를 수립하여 differential display polymerase chain reaction(DD-PCR)을 수행하였다.

2) DNA fragmentation assay

Apoptosis의 진행정도는 아가로즈 겔 상에서 genomic DNA의 절편화 현상을 관찰함으로써 알 수 있다. 이를 위해 세포(HepG2, HepG2-3X, CHL, CHL-X등)에서 genomic DNA를 추출하여 전기영동 하였다.

3) FACS analysis

세포에 미리 5uM DCFH-DA를 1시간동안 37°C에서 배양한 후 2mM FSH를 처리하고 peroxide level을 excitation 488nm, emission 530nm로 setting된 Bechton Dickinson FACScan flow cytometer로 측정하였다. superoxide anion을 측정하기 위해 10uM HE를 37°C에서 15분간 처리한 다음, intracellular superoxide anion levels을 excitation 488nm, emission 600nm로 setting된 Bechton Dickinson FACScan flow cytometer에서 사용한 EB fluorescence를 측정하였다.

2. 연구 결과

가. B형 간염 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴

간염 바이러스(HBV)는 인체에 간염, 간 경변 및 간암을 유발하는 주요인자로, 최근 HBV가 가지는 X 유전자에서 발현되는 X 단백질이 간세포의 신호전달 체계에 직접 작용한다고 보고되었으나, 그와 관련된 정확한 기작은 알려지지 않았다. 이러한 HBV의 간암 형성 기작에 관련된 HBx 단백질과 상호작용하는 신규 유전자를 Yeast two hybrid system을 이용하여 human fetal liver cDNA library로부터 발굴하고자 다음과 같은 실험을 수행하였다.

1) pAS2-1/HBx 플라스미드 제작

Yeast two hybrid system을 이용하여 human fetal liver cDNA library로부터 HBx와 상호작용하는 신규 유전자를 탐색하고자 yeast two hybrid system에 요구되는 플라스미드 pAS2-1/X를 제작하였다. (Fig.1) pAS2-1/X는 Yeast내에서 HBx 단백질을 발현하고자 HBx ORF (1-154 Amino Acids)를 플라스미드 pAS2-1의 제한효소 Pst I 과 EcoR I을 이용하여 재조합되었다.

2) Yeast two hybrid system 구축

재조합된 pAS2-1/HBx 와 Human fetal liver cDNA library에 대한 yeast co-transformation을 수행하여 yeast내에서 단백질을 발현시킴으로써 단백질간의 상호작용을 감지한다. 전체적인 실험은 Fig. 2. 와 같이 진행되었다.

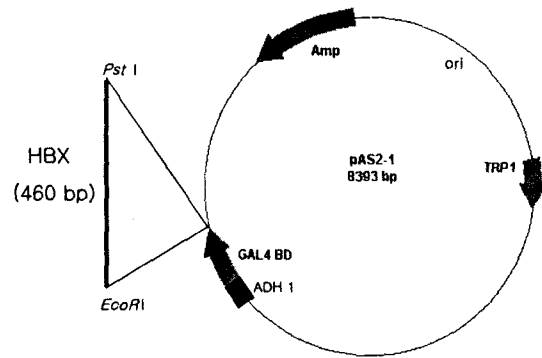


Fig. 1. HBx 발현 플라스미드의 제작

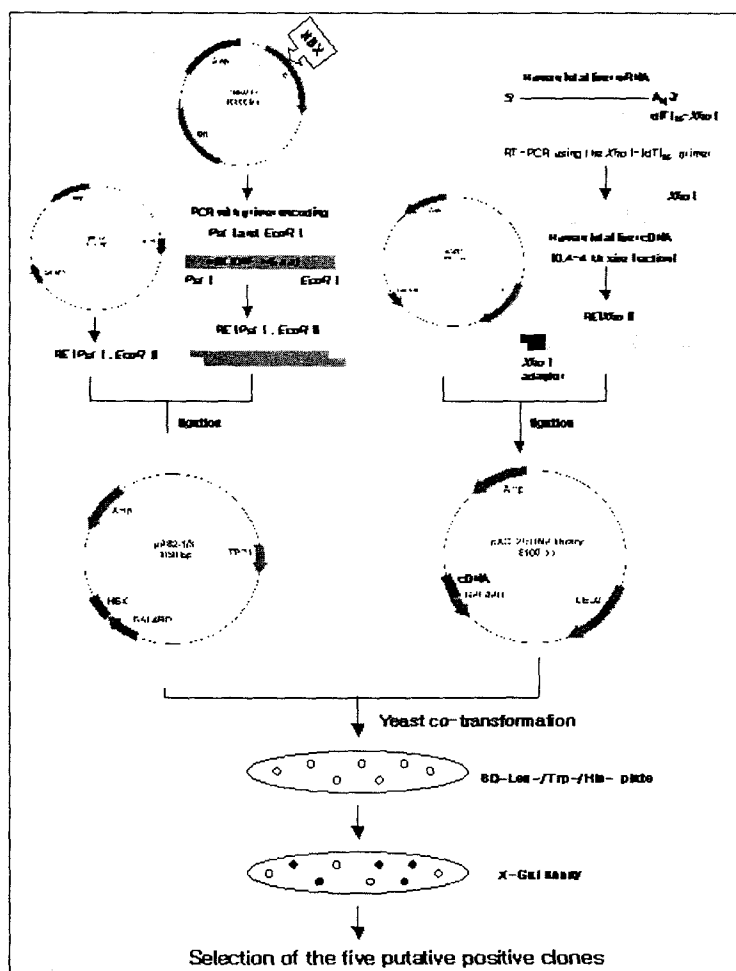


Fig. 2. Yeast two hybrid 스크리닝 모식도

3) Yeast two hybrid 스크리닝 결과

위와 같이 구축된 yeast two hybrid system에 의해 pAS2-1/HBx 와 pACT2-cDNA 공동형질전환체 3×10^6 개를 His⁻ plate에서 분리한 후 선택된 콜로니를 β -gal filter assay 실시한 결과 HBx와 상호 작용하리라 여겨지는 8개의 후보 양성 클론(putative positive clone)을 확보하였다 (Fig. 3, table1)

4) 후보유전자의 분석 결과

human fetal liver cDNA library로부터 HBx와 상호작용하는 유전자를 위와 같이 스크리닝한 결과 도출된 8개의 후보 유전자를 *E. coli*에 형질전환 시켜 염기서열을 분석하여 기존의 Histone deacetylase1 (HDAC1)과 유사한 염기 서열 구조를 가지고 있음이 밝혀졌다. 이 결과를 conform하기 위하여 pAS2-1/HBx와 pACT2/HDAC 플라스미드를 *S.cerevisiae*에 co-transformation 시킨 후 His⁻, β -gal filter assay 실시하여 상호 작용함을 확인하였다(Fig. 4.(b))

5) In vitro interaction 분석 결과

위의 결과로 도출된 후보 물질을 확인을 위해 간암세포주인 Hep3B내에서 발현된 HBx와 HDAC1 단백질의 상호작용을 Immuno-precipitation을 통해 in vitro 상에서 확인하였다. Fig4 (a)에서 보는 바와 같이 Hep3B 세포에 각각 HBx와 HDAC 1을 발현시킨 후 전체 세포 단백질을 HBx antibody로 immuno-precipitation 시키고 HDAC1 antibody로 western blot을 실시한 결과 HBx와 HDAC1 이 서로 결합함이 증명되었다. 이와 같은 결과를 토대로 B형 간염 바이러스의 진행에서 중요한 역할을 하는 HBx 단백질이 간세포내에서 histone deacetylase와 상호 작용함이 명확히 증명되었다.

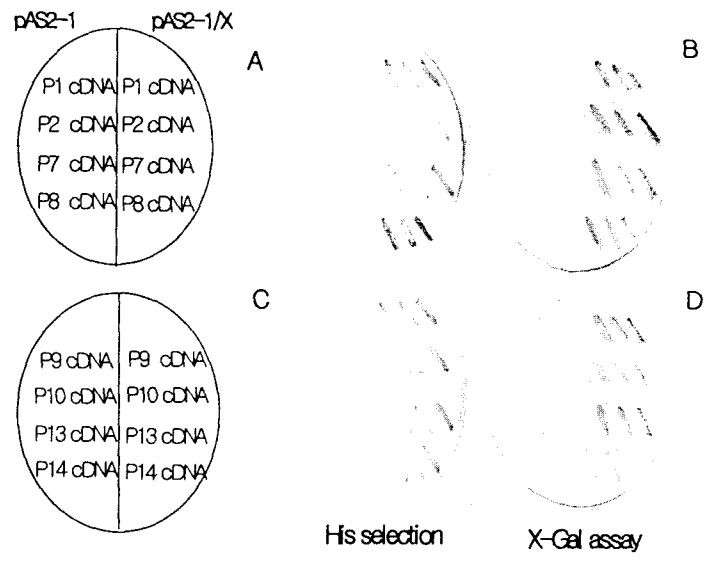


Fig. 3. Selection of the five putative positive clone

Table 1. Candidate genes with specific interaction of HBX

candidate genes	size(base pairs)	sequencing data	
		genes with homology	homology
p1	1500	CBP	95%
		Human gene for alpha-1-antitrypsin, 3'-flanking region	95%
p2	1000	human transporter gene Na ⁺ and H ⁺ coupled amino acid transport system	97%
p7	750	human metallothionein-II gene	96%
p8	750	human metallothionein-II gene	98%
p9	750	human metallothionein-II gene	97%
p10	1500	human chromosome 14 DNA sequence	98%
		human chromosome 14 DNA sequence	97%
		human gene for alpha-1-antitrypsin, 3'-flanking region	97%
p13	750	human metallothionein-II gene(mt-II)	99%
p14	1500	HDAC1	99%

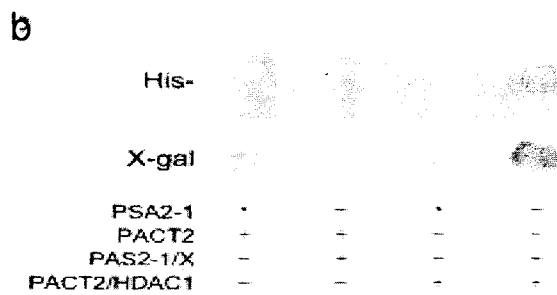
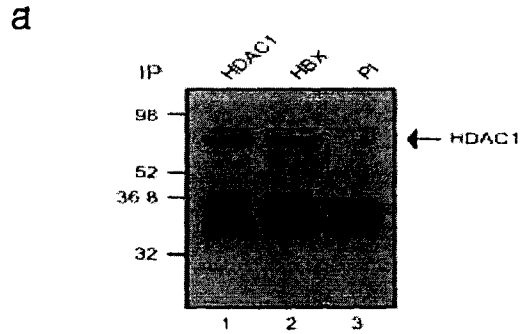


Fig.4 HBx interacts with HDAC1. (a) HBx and HDAC1 are part of a multimolecular complex: whole-cell extracts were immunoprecipitated with anti-HDAC1 (lane 1), anti-HBX (lane 2) or control (preimmune (PI) serum) antibodies (lane 3) and analysed by western blotting using anti-HDAC1 antibodies. (b) Specific interaction of HBX with HDAC1 in *S. cerevisiae*. Transformants were spotted on the plate, and the plates were photographed 3 days later. The sample positions are identical on each plate. Positive interaction is scored as blue on X-gal plate and as growth on His⁻ plate.

6) HDAC1 recruitment를 통한 HBx의 IGFBP-3의 downregulation

HBx는 multiple gene deregulation에 관련된 transcriptional co-activator로 알려져 있으므로 본 연구에서는 먼저 암억제 유전자의 하나로 알려진 IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-3) 발현에 HBx 단백질이 관련될 가능성을 조사하였다.

HBx를 transient transfection하거나 HBx를 영구발현시킨 세포주에서 IGFBP-3의 발현을 조사한 결과 HBx를 발현시키지 않은 경우에 비해 발현량이 mRNA와 protein level에서 모두 감소하였다.(Fig.5) HBx에 의한 발현량 감소에 프로모터의 어느 부위가 중요한 역할을 담당하는지 알아보기 위해 IGFBP-3의 프로모터 부위에 대한 mutation analysis를 수행하였으며 그 결과 HBx는 Sp1 site를 통해 IGFBP-3의 발현량을 감소시키는 것으로 증명되었다(Fig.6). 한편 Fig.7은 HBx에 의해 감소된 IGFBP-3의 발현이 HDAC inhibitor인 TSA에 의해 회복되며, 이때 HDAC activity는 HBx 단백질과 관련됨을 보여준다.

많은 transcriptional regulator가 acetylation 혹은 deacetylation에 의해 조절되는 것으로 알려져 있고 HBx에 의한 IGFBP-3의 발현 감소가 TSA에 의해 다시 증가하는 것으로 미루어 이 과정에 HDAC1의 관련성을 조사하게 되었다. 그 결과 HDAC이 HBx의 IGFBP-3 발현 조절에 관련되지만, HDAC1 단독으로는 IGFBP-3의 발현을 조절할 수 없으며 단지 HBx의 IGFBP-3 발현을 mediate하는 것으로 증명되었다 (Fig. 8).

나. 세포주기 변이 관련 유전자군의 발굴

1) HBx 복제 증가를 일으키는 중요 프로모터 부위 확인

세포주기 신호전달에 영향을 주리라 사료되는 HBx의 복제 증가 프로모터를 발견하였으며 그 염기 서열은 개시부위 106과 141번 앞쪽의 프로모터 상에 위치한다. (Fig.9)

2) HBx 프로모터 결합 단백질의 발굴

HBx 프로모터 결합 단백질을 발굴하기 위하여 λ Zap 벡터 라이브러리를 구축하고 probe를 이용하여 colony hybridization을 수행하여 1차 스크리닝을 하고 그 결과물을 south western으로 2차 스크리닝 한 결과 8개의 신규 단백질이 발굴되었다. 이중에 3개는 분석결과 hemoglobin β , γ , cytochrome p450으로 판명되었고 나머지는 확인 중이다. (Fig.10, 11, Table 2)

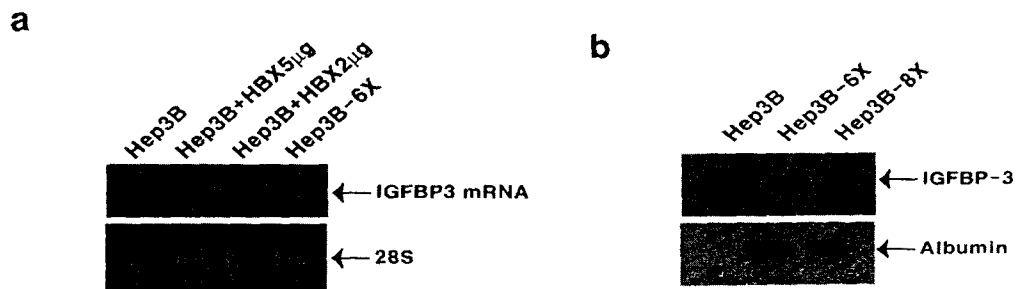


Fig. 5 HBX downregulates IGFBP-3 expression. (a) HBX downregulates the expression of IGFBP-3 mRNA. Cells were transfected either pMAM-X (2, 5, and 10 ug) or pMAM-neo, and then 15 ug of total RNA was analyzed by Northern blotting using ³²P-labeled full length IGFBP3 cDNA probe. (b) HBX downregulates the expression of IGFBP-3 protein. The expression of IGFBP3 protein was examined from medium of Hep3B, -6X, and 8X.

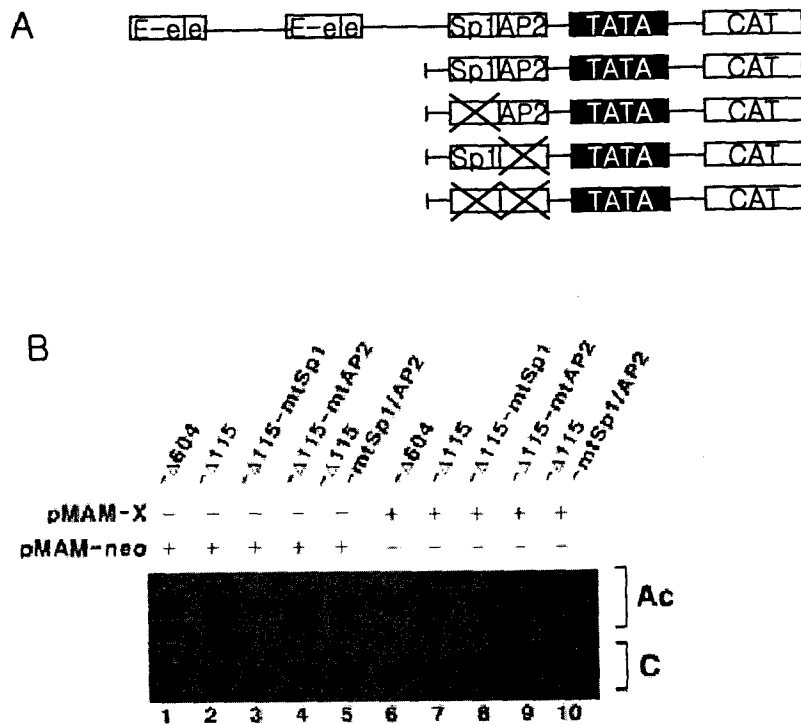


Fig.6 HBx repress IGFBP-3 Promoter through Sp1site. (a) Diagram of the human IGFBP-3 promoter. The mutations were introduced into the Sp1 site (CCCGCC) and/or the AP2 site (CCCCTC) contained within construct pGM41-115. The CC in Sp1 binding site and/or the CCC in AP2 binding site was changed to AA and/or AAA in pGM41-115-mtSp1, pGM41-115-mtAP2 and pGM41-115- mtSp1 /AP2. (b) Effect of HBx on transcription of the Sp1 binding site mutant and wild type in Hep3B. The parental plasmid pGM41-604 and the mutants were transfected into Hep3B cells.

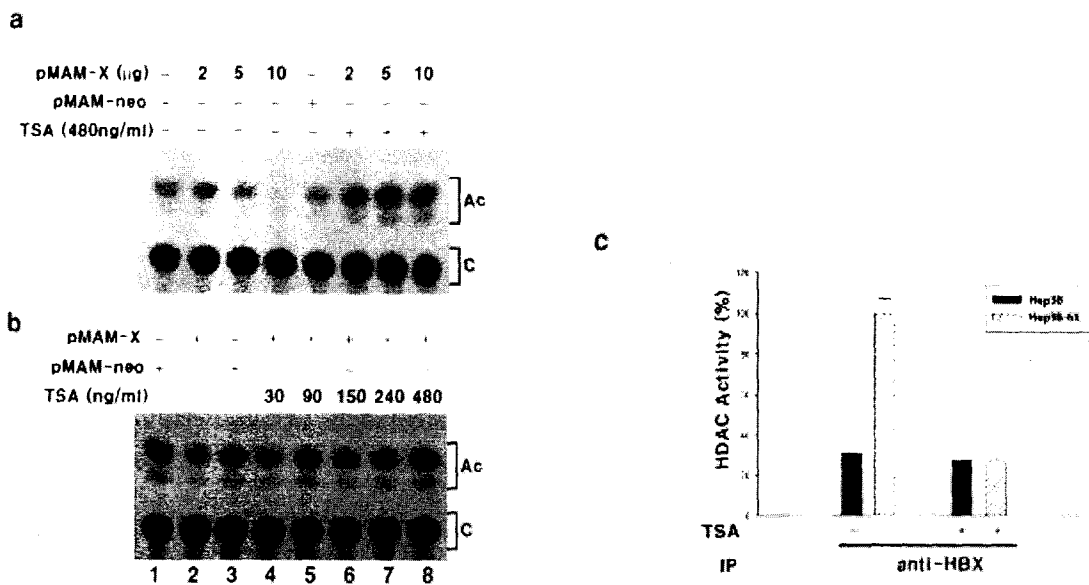


Fig.7 Trichostatin A treatment relieves IGFBP3 repression by HBV-X. (a) Effect of TSA on the repression of IGFBP3 by HBX in dose-dependent manner. Hep3B cells were transiently transfected with 5 ug IGFBP3-CAT reporter vector, 5ug pMAM-neo and the indicated doses of pMAM-HBX, and then cells were exposed either to medium alone or to medium containing 480 ng/ml TSA for 24 h, and then the expression of IGFBP3 protein was examined. (b) Dose response of TSA on the IGFBP3 repression by HBX. Hep3B cells were transiently transfected with 5 ug IGFBP3-CAT reporter, 5ug pMAM-neo and 5 ug pMAM-HBX, and then cells were exposed either to medium alone or to medium containing 30, 90, 150, 240 and 480 ng/ml TSA for 24 h, and then the expression of IGFBP3 protein was examined. (c) Histone deacetylase activity is associated with HBX. Hep3B-cell extracts were immunoprecipitated with anti-HBX or control(preimmune serum) and immunoprecipitates were assayed for deacetylase activity.

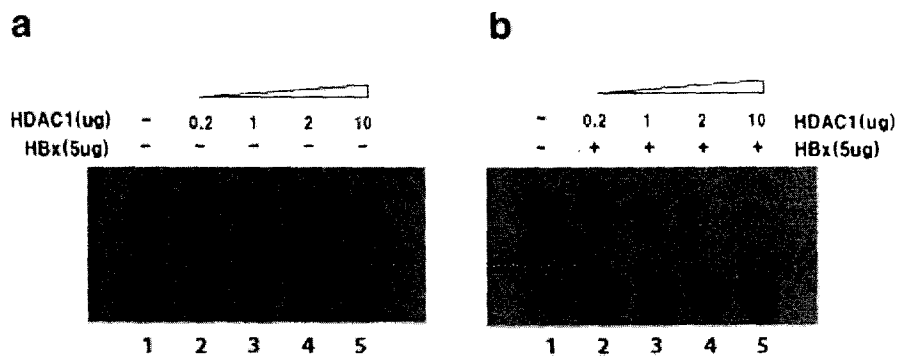
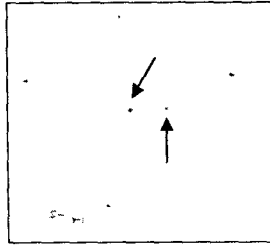
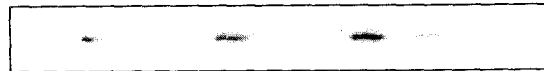


Fig.8 HDAC mediate HBx regulation of IGFBP-3. (a) HDAC does not downregulate the IGFBP-3 expression. Hep3B cells were transiently co-transfected with 3ug of IGFBP-3-CAT reporter and 0, 0.2, 1, 2 and 10ug of HDAC expression vector for measuring CAT activity. (b) HDAC mediate HBX regulation of IGFBP-3. 5ug of HBX expression vector, 0, 0.2, 1, 2, 10ug of HDAC expression vector and 3ug of IGFBP-3- CAT reporter were triple transfected in Hep3B cells for CAT assay.

A. 1st screening (colony hybridization)



B. 2nd screening (Southwestern)



Whole protein from clone
Hybridize with probe

Fig.10 Screening of novel HBx promoter binding proteins by colony hybridization

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

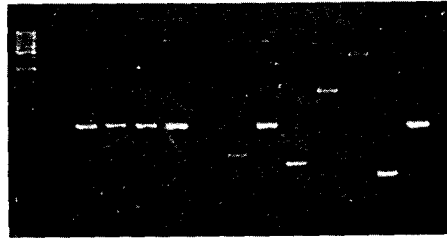


Fig.11 Determination of the genes from screening by PCR analysis

Table 2. Sequence determination of cloned genes which bind to HBx promoter region (-106 ~ -141)

Number of Clones	Name
1 to 4	unknown
6	unknown
7	Human Hemoglobin γ
8	NADH-Cytochrome P450 reductase
9	unknown
10	unknown
11	unknown
12	Human hemoglobin β

다. Apoptosis/anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴

1) HBx 영구 발현 간암 세포주 확보

세포주기 변이 관련 유전자를 발굴하기 위하여 먼저 세포주기 변이에 관련 후보 물질인 HBx 단백질을 영구 발현 시키는 간암 세포주를 제조하였다. 이를 위해 간암세포주인 HepG2, Hep3B 두가지 세포주에 MAM neo 벡터에 재조합된 HBx를 transfection시킨 후 선택 배지를 통해 HBx가 영구 발현되는 세포주를 순수 분리하였다. 순수 분리된 세포주의 염색체 DNA는 Fig.13에서와 같이 Southern blot을 수행하여 각각의 세포주에서 HBx DNA가 삽입되었음을 확인하였고 또한 Northern blot 분석을 통해 RNA가 정상적으로 발현됨을 확인하였다.

2) HBx와 apoptotic signaling의 연관성 조사

HBx는 mitochondrial physiology의 많은 부분을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구 결과에 의하면 HBx는 전자전달계 관련 mitochondrial enzyme들을 downregulation하는 것으로 밝혀졌다(Fig.13). 이는 HBx가 ROS-dependent apoptotic signaling에 관련된다는 것을 보여주는 것이다.

또한, HBx의 발현이 전자전달계의 inhibition과 oxidative phosphorylation의 uncoupling을 가져오는 것이 확인되었다(Fig.14).

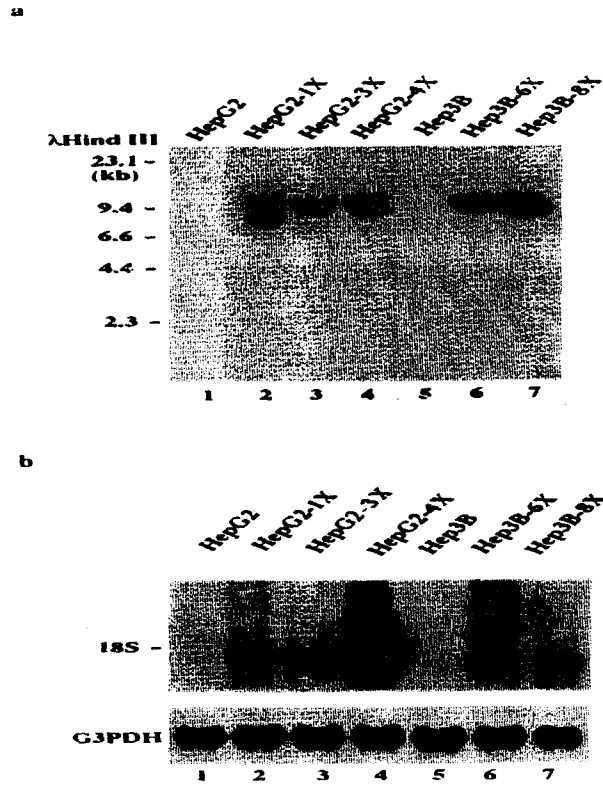


Fig.12 Integrations and expressions of HBx gene products in HepG2 and Hep3Bcells

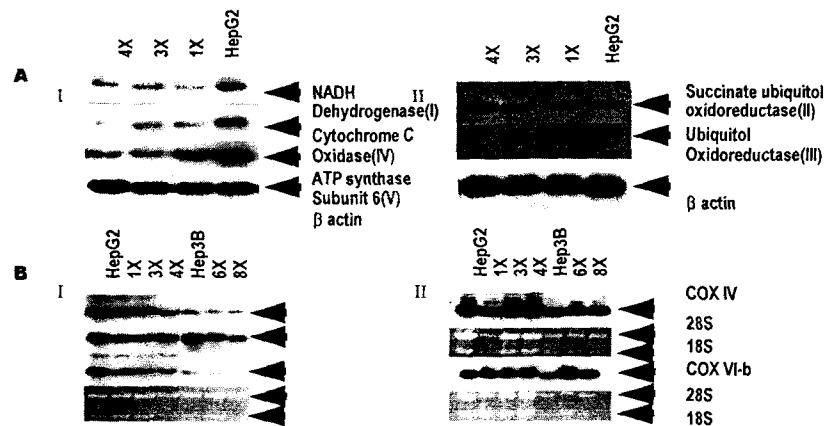


Fig.13 Mitochondrial enzymes involved in electron transport are down regulated by HBx.

- A. Northern blot analysis of the DD-PCR products. I. Northern blot analysis of NADH dehydrogenase, cytochrome C oxidase and ATP synthase subunit 6 on the mRNA of HepG2 and HBx expressing HepG2 cell line (1X, 3X and 4X). II. Northern blot analysis of succinate-ubiquinol oxidoreductase and ubiquinol C oxidoreductase probes on the mRNA of HepG2 and HBx expressing HepG2 cell lines (1X, 3X and 4X). β -actin was used for even loading.
- B. Northern blot analysis of cytochrome C oxidase subunits I, II and III (mitochondria encoded) And IV, VI-b (nuclear encoded) on the mRNA of HepG2 and HBx expressing HepG2 cell lines. Total RNA was shown as a control for even loading.

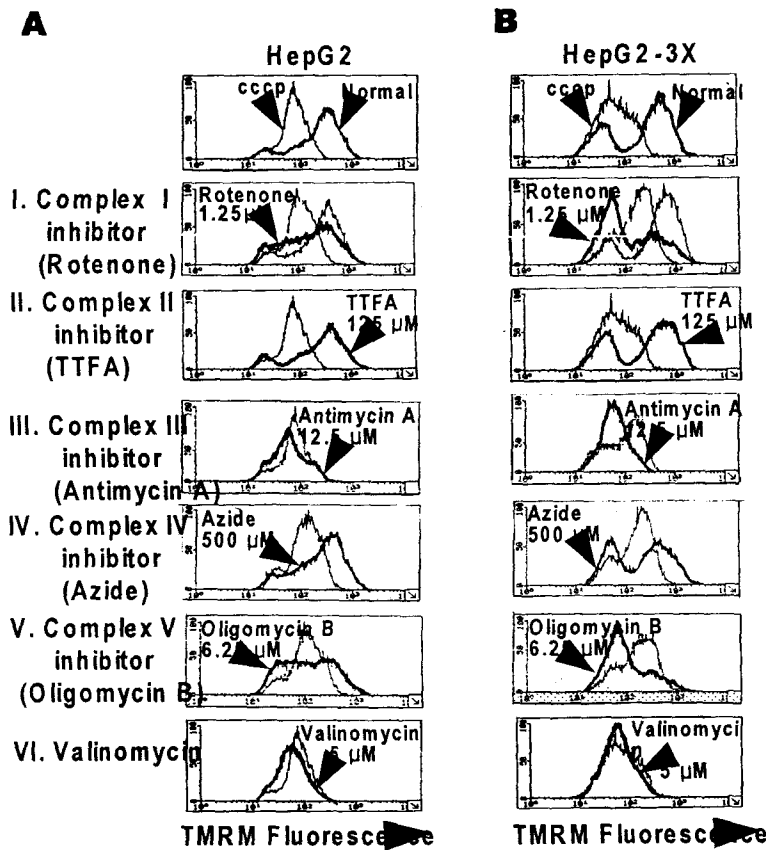


Fig.14 Effect of HBx expression on the inhibition of electron transport or uncoupling of oxidative phosphorylation in hepatoma cells. HepG2 and HepG2-3X cells were treated with rotenone (1.25 μ M), TTFA (125 μ M), antimycin A (12.5 μ M), azide (500 μ M), oligomycin B (6.25 μ M) and valinomycin (5 μ M) for 24 hr and the mitochondrial membrane potential was assessed with tetramethylrhodamine methyl ester(TMRM) by flow cytometry. For the positive control, the protonophore carbonyl cyanide n-chlorophenyl -hydrazone(CCCP):50 μ M) was used.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 최종목표

HBV-X 결합 단백질의 발굴과 기능 분석, Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴, 세포 주기변이 관련 유전자군의 발굴 및 기능 분석을 통하여 B형 간염 바이러스성 간암 생성 기작을 밝히고자 하였다.

2. 연차별 연구목표 대비 달성도

구분	연구목표	연구내용	달성도 (%)
1차년도 (2000)	B형 간염 바이러스 성 간암 관련 신규 유전자 발굴	HBX 결합 단백질 발굴	100%
2차년도 (2001)	세포 주기변이 관련 유전자군의 발굴 및 기능 분석/ B형 간염 바이러스 성 간암 관련 신규 유전자 기능 분석	HDAC의 HBx 전사활성 관련성 탐색 HDAC과 HBx의 결합 구조 탐색 HDAC의 HBx 전사활성 기작 탐색 HBx 프로모터 결합 신규 단백질 발굴	90%
3차년도 (2002)	Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴/ B형 간염 바이러스 성 간암 관련 신규 유전자 기능 분석	HDAC의 HBx 전사활성 기작 탐색 HBX와 CBP의 상호작용 탐색 HBX의 apoptosis 관련 유전자 발현 조절 조사	100%

3. 관련분야에의 기여도

본 연구를 통해 얻어진 HBX 단백질이 핵 내에서 HDAC1과의 상호작용을 통해 목표 유전자의 전사 활성을 조절한다는 새로운 연구 결과와 Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴 및 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴 결과는 B형 간염 바이러스성 간암의 생성 기작을 이해하는데 중요한 기반이 되는 것으로서 이 분야의 치료제 개발에 미칠 영향이 매우 크다고 하겠다. 또한 이러한 연구 결과는 HBV 이외의 여러 다른 바이러스의 세포 내 작용 기전에 관한 연구 방향에도 새로운 단서를 제공할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기초 연구 분야의 활용계획

B형 간염 바이러스에 의한 간암 생성과 관련하여 HBV-X 단백질은 간암 생성에 중요한 인자로 인식되고 있다. 특히 HBX 단백질은 세포질 내에 존재하고 있다가 핵 내로 이동하여 다른 유전자들의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있으므로, 이와 관련한 HBX 결합 단백질의 발굴은 B형 간염 바이러스성 간암 생성 기작을 밝히는 중요한 단서가 될 것으로 여겨져 왔다. 본 연구를 통하여 새로이 밝혀진 HBX 결합 신규유전자 Histone deacetylase1(HDAC1)이 HBX와의 상호작용을 통해 암 억제 유전자 IGFBP-3의 발현을 억제한다는 사실은 본 연구진에 의해 최초로 밝혀졌으며, 계속 진행되고 있는 상호작용 기작에 관한 연구는 간암 생성 기작의 중요한 단계를 이해하는 핵심적인 역할을 할 것으로 사료된다. 더불어 Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴 및 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴 결과는 B형 간염 바이러스성 간암의 생성 기작을 이해하는데 중요한 기반이 될 것이며, HBV 이외의 여러 다른 바이러스의 세포 내 작용 기전에 관한 연구 방향에도 새로운 단서를 제공할 것으로 기대된다.

따라서 본 연구진은 이번 연구결과를 바탕으로 B형 간염 바이러스의 간암생성 기작에 관한 보다 포괄적인 이해를 얻기 위해, HBx에 의한 목표유전자의 전사조절에 관한 연구를 methylation, acetylation 등의 epigenetic regulation의 각도에서 진행할 계획이다.

2. 경제, 산업적 활용 가능성

B형 간염 환자는 전 세계적으로 4억명, 국내에만도 300여만 명이 있는 것으로 추정되고 있으며, 국내외적으로 항 바이러스 시장이 높은 관심을 끌고 있다. HBX 단백질과 결합하여 바이러스의 증식과 암형성에 중요한 역할을 하는 표적 분자를 밝혀낸 것과 HBX 단백질에 의한 세포주기와 apoptosis 관련 유전자의 발굴은 바이러스의 작용 기전에 대한 이해를 통해 표적분자의 저해제 등을 이용한 신약 개발 등의 가능성을 시사한다. 본 연구를 통해 얻어진 HBX 단백질이 핵 내에서 HDAC1과의 상호작용을 통해 목표 유전자의 전사 활성을 조절한다는 새로운 연구 결과와 Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴 및 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴 결과는 B형 간염 바이러스성 간암의 생성 기작을 이해하는데 중요한 기반이 되는 것이라 할 수 있다. 또한 HBV의 세포 내 유전자 조절 메커니즘에 관한 이번 연구 성과는 항바이러스제의 개발 등에 새로운 연구 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 암 발생과 acetylation

아세틸화 (acetylation) 현상은 히스톤 단백질의 acetylation으로 잘 알려진 주요 post-translational modification 과정 중의 하나이다. 진핵 세포의 DNA는 히스톤이라는 염기성 단백질에 감겨 nucleosome을 형성하면서 좁은 핵 내 공간에 압축, 저장되어 있는데 이 압축된 정보를 활용하기 위해서는 적절한 시기에 이 구조를 느슨하게 풀어주고, 또 다시 압축해 주는 구조적 변화가 요구된다. 이 과정에서 히스톤 단백질의 acetylation과 deacetylation은 chromatin의 구조적 변화를 일으키는 동시에 유전자 발현의 조절을 가져오는 중요한 역할을 담당하고 있다 (Hassig and Schreiber, 1997; Kuo and Allis, 1998). 이러한 히스톤의 acetylation은 질병관련 특정 유전자의 발현 조절에 깊은 관련이 있으며, 히스톤 단백질의 deacetylation을 유발하는 HDAC은 저산소증, 세포암화 등 열악한 환경조건에서 고발현되어 암 억제 유전자의 발현을 저해함으로써 세포의 증식을 촉진시키는 역할을 수행함이 최근 밝혀졌다. 특히 HDAC의 특이적 저해제인 TSA를 이용한 연구는 HDAC이 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 함을 밝히는데 큰 역할을 하였고, TSA를 비롯한 HDAC의 선택적 저해제는 HDAC의 비정상적 활성으로 인한 암 발생의 치료에 유용한 항암제로서 주목받고 있다.

최근 HAT과 HDAC의 비정상적인 활성 및 recruitment에 의해 유도된 유전자 발현이 암 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. acute promyelocytic leukemia 세포주에서 비정상적으로 HDAC이 recruitment되어 특정 유전자를 발현시키고 이는 암발생에 직접적 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. 또한 HPV에 의한 자궁경부암의 발암기전에도 oncoprotein인 E7이 암 억제단백질이면서 전사인자인 IRF-1 (interferon regulatory factor-1)의 활성을 억제하는 것이 확인되었다 (Park et al., 2000). 이와 같은 결과는 HDAC 효소 활성 및 그의 complex 형성은 세포의 분화뿐만 아니라 암화에도 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있다. IGFBP3는 세포성장, 분화, 사멸 등에 관련된 단백질인 IGF의 생물활성을 조절하며 상호작용 하는 것으로 알려진 단백질 중의 하나로 본 연구진에 의해 얻어진 예비 결과에 의하면 p53-mutant human hepatocellular carcinoma인 Hep3B에서 억제되어있던 IGFBP3 유전자의 발현이 TSA 처리에 의해 유도되었으며 이 과정이 프로모터의 SP1 binding site에 의해 매개되는 것으로 확인되었다. 또한 바이러스와 세포의 유전자 전사를 활성화할 뿐아니라 세포분열과 세포사멸을 coordination 하는 것으로 알려진 HBx 단백질이 HDAC과 상호작용하는 것으로 본 연구진에 의해 확인되었다. 따라서 두가지 예비 결과로부터 HDAC과 HBx의 역할과 tumor suppressor

gene의 발현과의 상관관계를 규명하는 것은 간암 생성 단계의 규명에 중요한 실마리를 제공할 것으로 기대된다.

2. HBx에 의한 ROS generation

최근 몇몇 논문에서는 ROS는 receptor signaling에서 intracellular messengers로서 작용할 수 있음을 제시하였다. ROS는 세포가 TGF- β 1, platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor, epidermal growth factor(EGF), TNF- α 와 IL-1과 같은 몇몇 성장인자들에 의해 자극을 받아 다양한 형태로 생성되어 진다. 이러한 ROS의 생산은 NF- κ B, egr-1, AP-1, mitogen-activated protein kinase(MAPK), phospholipase와 같은 전사 인자의 활성화에 의한 세포자살의 유도 및 protein tyrosine phosphatases의 억제에 관여한다. 따라서 ROS는 전사인자의 조절자(regulators)와 protein tyrosine phosphatases의 억제제(inhibitors)로써 역할을 수행한다. 본 실험실에서 최근에 PKC와 p44/p42 MAPK cascades가 HBx에 의한 Sp1-mediated IGF-II gene expression의 필수적인 signal pathway임을 밝혔다(Kang-Park et al., 2001). TGF- β 1의 경우에는 다양한 cell lines에서 ROS 생산을 자극하고, 생산된 ROS는 목적 유전자 발현(target gene expression)을 증가시켰다. 또한 signal pathway상에서 Ca⁺⁺ influx, MAPK 활성화, AP-1 활성화 등을 유발한다 (Shih et al., 2000).

3. HBx에 의한 cell cycle arrest, apoptosis, anti-apoptosis 유발에 관한 연구

HBx는 multifunctional protein으로 현재 cell cycle arrest, apoptosis, anti-apoptosis 유발에 관한 활발한 연구가 이루어지고 있다. cell cycle arrest와 관련하여 human hepatoma cells에서 HBx protein이 p21waf1/cip1의 발현을 증가시키고 p53-independent pathway에서 G1-->S 전이를 연장시킴이 알려져 있다 (Park et al., 2000). Activated ras oncogene은 HBx-mediated apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있으며 (Ryu Ws et al., 2001), HBx가 PI3-kinase-dependent survival signaling cascade를 활성화시키는 것이 밝혀졌다 (Lee et al., 2001).

제 7 장 참고문헌

1. Kim et al., *Nature*, 351: 317-320, 1991
2. Park et al., Inactivation of Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 275: 6764-6769, 2000
3. Kang-Park et al. 2001, Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *BBRC*, 283, 303-307
4. Shih et al. 2000, Hepatitis B Virus X Protein Inhibits Transforming Growth Factor--induced Apoptosis through the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 25858-25864.
5. Park et al., Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1-->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene*. 2000 Jul 13;19(30):3384-94.
6. Ryu Ws et al., Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2001 Jan 4;20(1):16-23.
7. Lee et al., The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):16969-77.
8. Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1997). Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation : HATs off to HDACs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:300-308.
9. Kuo, M. H. and Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. 20: 615-626.

제 5 부

B형 간염 바이러스의 간암발생의 면역유전학적 인자규명

협동연구기관 : 연세대학교

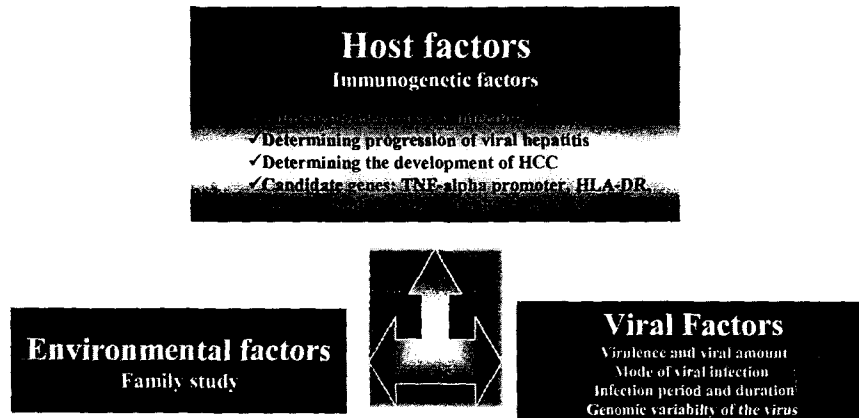
협동연구책임자 : 한 광 협

제 1 장 연구개발과제의 개요

가. 연구배경

바이러스성 간염은 감염 후에 다양한 임상경과를 갖게 된다. 즉 감염 후 자연회복에서부터 만성 무증상 바이러스 보유상태, 만성간염, 간경변 뿐 아니라 일부에서는 간암으로 진행하기도 한다. 지금까지는 B형 간염과 C형 간염에서 감염 후 병태생리에 관한 연구를 통하여 바이러스의 지속적 감염상태와 숙주의 면역상태에 따라서 임상경과가 다양하게 나타남을 알 수 있었다. 그러나 아직까지 감염 후 이렇게 임상경과가 다양한 이유가 충분히 규명되지 않은 상태이다. 이러한 임상경과에 현재로서 바이러스 요인(viral factor), 숙주 요인(host factor), 환경적 요인(environmental factor)등이 복합적으로 관여할 것으로 추정하고 있다. 지금까지 바이러스의 요인에 대하여서는 광범위하게 연구 조사가 이루어져서 바이러스 감염시기, 감염 시 바이러스의 양, virulence 등이 관여할 것으로 여겨지며 virus의 유전적 다양성으로 유전적 변이형이 아울러 관여할 것으로 조사되었다. 그러나 일관성 쌍둥이와 이관성 쌍둥이와 같이 동일한 바이러스에 감염된 상태에서도 다양한 임상경과가 나타날 수 있음이 연구 조사되어 숙주의 유전적 환경이 아울러 중요할 것으로 시사되었다. 최근 분자 유전학적 방법의 발전으로 인체 유전자의 다양성을 발견하는 능력의 개선으로 질환과의 관련성을 밝히는 것이 가능하여져 이러한 접근은 만성 바이러스성 간염에서 바이러스의 지속성과 간경변이나 간암으로 병이 진행되는 기전을 규명하고 이해하는데 새로운 도움을 줄 수 있다. 과거에 HLA에 초점을 둔 유전적 연구가 제한된 연구 접근방법과 대상자의 차이, 인종적 차이를 극복하지 못하였을 뿐 아니라 linkage-disequilibrium과 같은 유전자의 nonrandom association으로 관련성 규명에 실패하였으나 최근 genome wide scans이나 대규모 polymorphism screening 등의 진보된 분자생물학적 기술로 대상자를 대규모로 다양한 유전 부위를 검색하는 것이 가능하게 되어 이 분야의 깊이 있는 연구가 가능하게 되었다. 후보유전자란 특정질환에 대한 감수성이나 경과에 영향을 주는 유전자를 말하며 실질적으로 유전적 다형성과 질환과의 연관성이나 가족력을 조사하여 확인할 수 있다. 실질적으로 HIV에서 chemokine receptor CCR5가 CD4 cell의 HIV-1의 침입경로에 coreceptor로 작용하여 이 유전자 부위의 32 bp deletion (CCR5 32)의 homozygous는 감염에 저항성을 갖고 있으며 heterozygous는 병의 진행이 늦다는 사실이 밝혀진 바 있다. 또한 면역유전자 중 Major Histocompatibility Complex (MHC)는 chromosom 6의 short arm에 위치하며 compliment, TNF-alpha, HLA complex 포함한 여러 단백질 생성에 관련된 암호가 입력된 부위로 면역유전적 요인에 매우 중요한 부위에 해당함을 알 수 있다. 따라서 특정 바이러스의 감염 경과와 유전자간의 관련성의 발견은 바이러스의 발병기전을 이해하고 규명하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

Factors influencing the outcome of viral hepatitis



1) Genetics and Hepatitis Virus

지속적 감염바이러스의 감염상태에서 감염에 대한 감수성의 차이에 결정적 관여하는 유전자를 확인하는 연구가 최근 활발히 진행 중이며 일부 관련성을 시사하는 유전자가 검색되고 있다. 그 중에서도 바이러스 감염에 대항한 숙주 면역반응에 관여하는 유전적 요인이 주요할 것으로 여겨진다. 실질적으로 B형 감염 바이러스의 nucleocapsid antigen에 대한 CD4⁺ T-helper cell 반응이 급성 감염환자에 비해 만성 감염환자가 현저히 낮은 점과 CD4⁺ T-helper cell 이 antigenic peptide를 이송하는 HLA class II molecule과 T cell 수용체의 상호작용에 의해 자극된다는 점은 이미 확인된 사실이다. 따라서 MHC class II allele sequences의 다양성에 따라서 antigenic peptides 와 연관될 수 있다. Thursz 등은 Gambia 원주민 집단에서 molecular MHC genotyping을 시행하여 HLA-DRB1*1302와 HBV의 지속적 감염과 역상관성이 있음 처음 확인하였고 이러한 연관성은 Holer 등의 유럽인 대상 연구에서 확인되어 인종적 차이와 무관하게 관련성이 있음이 입증된 바 있다. 그러나 아직까지 질환의 임상 경과와 특정 유전자와의 연관성에 관한 기전이 충분히 규명되지 않았다. 이것은 여러 alleles를 포함하는 복합체의 상호작용, 인종간의 차이, linkage disequilibrium에 있는 유전자와 연관성 등에 기인 할 것으로 생각된다. 병의 진행과의 연관성에 관련된 연구에서는 재연성이 있었던 연구는 아직 없었다. 비록 이론적

으로 HLA class I 이 바이러스 감염에 중요한 역할을 함에도 불구하고 대규모 유전적 연구가 없었던 점으로 이 분야에 보다 연구가 필요하다.

2) TNF- α Promoter 부위의 유전자의 다형성과 HBV

단핵세포와 마크로파아지에서 주로 분비되며, 염증 반응에 주된 사이토카인이다. TNF- 유전자는 인간 6번 염색체의 단완에서 HLA-B 와 DR 사이, 즉 MHC class III 부위에 위치하는데, 유전자의 promoter 부위 중 -163, -238, -308, -376 에서 guanine(G)에서 adenine(A)으로 점돌연변이가 일어나는 것으로 밝혀져 있다. 하지만 이 중 TNF- 의 발현에 직접적인 영향을 미치는 것은 -308 번과 -238번 부위의 G?A전환 (single nucleotide polymorphism)이다. 특히 -308 번에서 A 로의 전환이 일어난 경우, 전환이 일어나지 않은 개체에 비해 전사 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다.

이러한 유전적 다형성이 TNF- 발현이나 분비 증가와 직접적으로 관련되어 있는 지에 대해서는 논란이 많은 실정이며, 다형성이 있는 군과 없는 군 사이에 TNF- α 분비량 차이가 없다는 보고들이 있는 반면, 다형성이 있는 군에서 의 분비가 증가되어 있다는 상반된 보고도 있다.

TNF- α 는 B형 간염바이러스 감염 시, 감염된 간세포를 제거하는 데 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, HBV의 유전자 발현과 증식을 억제시킨다. 일부 연구자들은 -308 번 위치의 유전적 다형성이 1형 자가면역성 간염에서 불량한 치료반응 및 간경변으로의 이행 가능성 증가와 관련 있음을 밝혔으며, 원발성 경화성 담관염(primary Sclerosing Cholangitis) 에서도 -308번의 유전적 다형성이 관여됨을 보고한 바 있다. 한편 B형 바이러스성 간염에 대하여는 Hohler등이 -238번 위치의 유전적 다형성과 만성간염간의 연관성을 밝혔다. 하지만 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고-308번의 유전적 다형성이 B형 간염의 바이러스 제거나 만성화에 어떤 영향을 미치는가에 대해서는 보고가 없는 실정이다.

3) Mannos binding lectin gene(MBL) 와 HBV

Mannose Binding Lectin(MBL)gene의 돌연변이와 B형 간염 바이러스 감염이 관계가 있음이 처음으로 보고되었는데 이들은 Cocassian중에서 MBL gene의 codon 52부위의mutation이 병의 progression 과 관계가 있음을 밝혔다. (Thomas et al., Yhe Lancet 1996; 348: 1417-1419). 이 후에 홍콩에서 HBV와의 관계를 보고 (Yuen et al., Hepatology 1999; 29: 1248-1251) 하였고, 일본에서는 MBL gene 의 돌연변이가 HCV의 감염과 관계가 있음을 연구 하였다. (Matsushita et al., J. of Hepatology 1998;695-700. Matsushita et al., Arch Viral. 1998;143:645-651). 그러나 병의 다양한 진행에 따른 MBL gene 의 mutation에 대한 자세한 보고는 아직 없는 실정이다.

나. 연구목적

B형 감염은 감염 시기에 따라 만성화율이 다르다. 즉 성인기에 급성 감염에 이환되었을 경우 만성화율은 5%에 불과한 반면, 신생아기에 모체로부터 감염되었을 경우 만성화율은 90%에 달한다. 이와 같은 감염시기 뿐 아니라 바이러스 자체의 유전자형도 각 질병상태(보유자, 만성간염, 간경변, 간암)에서 그 발현 정도에 차이가 있는 것으로 보아 질병 진행에 관여할 가능성도 배제할 수 없다.

하지만 감염에서는 이러한 바이러스 자체의 요소 외에 숙주 인자도 배제할 수 없다. 즉 감염된 개개인이 있어서 바이러스의 효과적인 제거가 일어날 수도 있고 만성화나 전격성 감염으로의 이행이 일어날 수도 있다. 이러한 차이에는 다양한 인자가 작용할 것으로 보이나 본 연구에서는 HBV의 감염 후 경과에 영향을 주는 숙주의 면역유전학적 요인의 규명 및 주요 관련 유전자 발현을 위하여 HBV 감염시 HBV제거에 관여하는 특정유전자형(HLA Class II DR genotype)분석과 HBV 감염진행으로 간암유발과 관련성 있는 후보유전자 검색을 주 목적으로 삼아 실험을 진행하였다.

다. 연구 목표 및 내용

1) 다양한 HBV 감염상태와 TNF- α promoter gene polymorphism간의 연관성에 관한 연구 및 간염 진행 및 간암발생과 관련된 HLA 유전자 분석과 후보유전자 관련성 규명을 위한 study ; TNF- α promoter gene polymorphism 과의 관련성 확인을 위한 대단위 연구와 가족 내 유전적 요인 규명, HLA-DR TYPE 등 특정유전자와의 연관성 조사 간염 진행군과 비진행군에서 HLA-genotyping을 비롯한 후보유전자 검색을 시행하여 관련 유전자형 발현을 위한 pilot study 시행하였다.

2) Mannose Binding Lectin gene의 돌연변이와 B형 간염 바이러스에 의한 간질환과의 관계 규명 B형 간염바이러스에 의한 간질환의 정도에 따라 환자의 혈액으로부터 MBL 유전자의 point mutation 조사 및 질환과의 연관성 연구 ; 상기 환자의 serum으로부터 혈액 내 MBL 단백질의 농도 조사를 통한 질환과의 상관 관계 연구, 다양한 감염상태의 환자로부터 MBL gene point mutation과 TNF- α promoter gene polymorphism 간의 연관 관계에 관한 연구 - MBL 유전자의 codon 52(CGT->TGT), 54(GGC->GAC), 57 (GGA->GAA) point mutation 조사, 약 250여 환자 sample로부터 확보한 유전자를 sequencing 및 SNaP shot 분석을 통해 두 유전자간의 상관관계를 연구하였다.

3) 간암 발생 가족 내 가계도와 유전적 요인의 관련성에 관한 연구

; 간암 발생 가족내 B형 간염 감염후 임상적 다양성과 유전적 요인과의 관련성을 조사하기 위한 가계도 조사 및 혈액 채취로 검체 확보후 TNF- α promoter gene polymorphism을 비롯한 후보유전자 간의 연관 관계에 관한 연구 B형 간염 바이러스의 가족내 수직감염, 감염율 및 다양한 간질환 형태의 상관관계 분석 TNF- α promoter gene polymorphism, 유전적 요인 규명, HLA DR 특정유전자와의 연관성 조사하였다.

- 위 결과를 토대로 가족내의 B형 간염의 만성화나 간암으로의 진행이 host 요인으로부터 비롯되는지를 검증

III. 연구 방법

B형 간염에 노출되지 않은 환자군(B형 간염에 대한 모든 표지자 음성), B형 간염에 이환되었다가 치유된군(HBsAg:-, Anti-HBc:+, Anti-HBs:+). e항원 음성 만성 보유자군(HBsAg:+, HBeAg:-, 혈청 transaminase:정상), 만성 B형 간염, B형 간염으로 인한 간경변 및 간암등을 포함한 진행성 질환군등 총 4개군 환자를 대상으로 하였다.

TNF- α promoter 의 유전적 다형성을 보기 위한 실험은 다음의 순서로 시행하였다. 환자의 혈액에서 QIAamp DNA Blood MiniKit(QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA)를 이용, DNA를 추출한 후 TNF- α 유전자 5' untranslated region 의 -396에서 -69에 해당하는 328bp부위를 primer를 이용, PCR로 하였다. [Primer : TNF-396(5' TTCCT GCATC CTGTC TGGAA 3') TNF-69(5' CAGCG GAAAA CTTCC TTGGT 3')] 이때 검체 1ul에 TNF- α 69 primer(20 pmol/ul) 0.5 ul과 TNF- α 396primer 0.5 ul, dNTP 2ul, 10X buffer 5ul, 증류수 40.5ul, Taq polymerase 0.5ul을 혼합하여 총50ul로 만들어서 94도 5분, 55도 1분, 72도 1분의 순서로 총 35 사이클 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동후 QIA quick PCR purification kit(QIAGEN inc. Valencia, CA, USA)으로 정제하였다. 이어서 검체 4ul, 증류수 6ul, SA phosphatase 2ul을 혼합, 37도에서 1시간, 72도에서 15분 반응시켰다. 다음 ABI Prism[®] SNaPshort TM ddNTP primer extension Kit를 사용하여 308과 -238부위의 G->A 전환 여부를 알아보았다. 반응은 rr mix 1ul, DNA 1.5 ul, primer(0.5 pmol/ul) 2ul, 2X buffer 4ul, 증류수 1.5ul를 혼합하여 총 10ul로 반응시켰고 온도는 96도 10분, 50도 5분, 60도 30분의 순서로 총 25 사이클 진행시켰다. 이 과정에서 primer 로는 -308 sense(5'AATAG GTTTT GAGGG GCATG 3'). -308 antisense (5' TTTTT TCTGG AGGCT GAACC CCGTC C3'), -238 sense (5' TTTTT TTTTT TTTTT TAGAA GACCC CCTC GGAAT C 3'), -238 antisense (5'TTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT ACTCC CCATC CTCCC TGCTC

3')가 각각 사용되었다. 여기서 얻어진 검체는 10ul 당 SA phosphatase 2ul을 혼합하여 37도에서 1시간, 72도에서 15분 반응시킨다. 이후 denaturation 과정으로서 deionized formamide 20ul에 최종 산물 1ul을 첨가하여 95도에서 5분간 반응시켰다.

MBL 경우 TNF-a와 같은 방법으로 DNA를 추출하였으며 Primer는 5'-CTGTGACCTGTGAGGATGC-3, 와 5-AGAGGAAACTGCCTGGGA-3를 합성하여 사용하였다. PCR Product를 purification 한 후 역시 TNF-a 와 동일한 방법으로 SNP assay를 하여 각 부위의 mutation을 관찰하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

세포성 면역반응 및 면역반응의 유전적 소인은 만성 B형 간염 병태생리의 근간을 이루는 중요한 부분으로 만성 바이러스성 간염에서 간암발생과 관련된 human genome 규명에서 candidate gene analysis 방법으로 질환과의 연관성을 보는 것이 중요하다. TNF- α 는 B형 간염 바이러스(HBV) 감염시, 감염된 간세포를 제거하는 데 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, HBV의 유전자 발현과 증식을 억제시킨다(Guidotti et al. Immunity 4:25, 1996). TNF- α 유전자는 HLA-B와 -DR 사이, 즉 MHC class III 부위에 위치하는데, 유전자의 promoter 부위 중 -308번과 -238번 부위의 G \rightarrow A 전환(single nucleotide polymorphism)이 TNF- α 의 발현에 중요하다고 알려져 있다(Wilson et al. J Exp Med 177:557, 1993; DAlfonso et al. Immunogenetics 39:150, 1994). 특히 -308번에서의 A로의 전환은 TNF- α 발현 증가와 관련이 있다.(Wilson et al. Br J Rheumatol 33:89, 1994) 일부 연구자들은 -308번의 polymorphism이 1형 자가면역성 간염에서 불량한 치료반응 및 간경변증으로의 진행 위험과 관련이 있음을 밝혔으며(Czaja et al. Gastroenterology 117:645, 1999), 원발성 경화성 담관염(Primary Sclerosing Cholangitis)에서도 -308번의 polymorphism이 관여됨을 보고한 바 있다(Bernal et al. J Hepatol 30:237, 1999). B형 바이러스성 간염에 대하여는 Hohler등이 -238번 위치의 polymorphism과 만성 간염간의 연관성을 밝혔다(Höhler et al. Clin Exp Immunol 111:579, 1998). 한편 국내 B형 간염 바이러스 만성 보유자군의 2.4%, 자연 치유군 중 14.8%가 보유하고 있다고 본 교실에서 보고(Ahn et al. Hepatology 31:1371, 2000)한 HLA-DRB1*13의 일부 유전자형은 B형 바이러스성 간염의 만성화에 대해 보호기능을 하는 것으로 알려져 있다.(Thursz et al. NEJM 332:1065, 1995; Höhler et al. J Hepatol 26:503, 1997)

HBV에 대한 인체의 면역반응 중 HBV 제거에 관여하는 숙주의 특정 유전인자의 규명과 만성 B형 감염으로 인한 간암발생시 유전적 요인에 대한 규명 역시 현재 절실히 필요한 상태이나 별로 연구된 바가 없고 단지 B형 간염에서 HBV clearance 와 HLA Class II와 관련성이 입증되었고 HLA Class I은 관련성 깊을 가능성이 있을 것으로 기대되나 관련성에 대한 연구가 미흡하다. 특히 임상경과와 연관하여 질환 진행과 간암발생과 관련되어 규명된 연구가 전무한 상태이며 TNF-alpha, MBP (Mannose Binding Protein), Vitamin D receptor등이 가능 후보로 검토되나 바 없는 상태이다. 따라서 새로이 간암발생과 밀접한 관련이 있는 바이러스성 간염의 진행과정에 관련이 있는 인체의 유전자를 확인하는 연구는 상당히 많은 환자군을 screening 하여 얻어질 수 있으며 적절한 대조군을 확보해야 한다는 문제가 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. B형 바이러스성 간염의 다양한 감염상태와 TNF- α promoter polymorphism 간의 연관성에 관한 연구

B형 간염에 노출되지 않은 군(UE) 60예, B형 간염에 감염되었다 회복된 군(SC; HBsAg:-, Anti-HBc:+, Anti-HBs:+) 84예, 비활동성 만성 보유자군(NP; HBsAg:+, HBeAg:-, 혈청 transaminase: 정상) 66예, 만성 B형 간염, B형 간염으로 인한 간경변 및 간암 등을 포함한 진행성 질환군(PG) 160예 등 총 370예를 대상으로 환자의 혈액에서 DNA를 추출한 후, TNF- α 유전자 5' untranslated region의 -396에서 -69에 해당하는 328bp 부위를 primer를 이용, PCR로 증폭한 다음 ABI Prism SNaPshot™ ddNTP primer extension kit을 사용하여 -308과 -238 부위의 G→A 전환 여부를 확인하였다. 연구결과 promoter -308 부위의 G→A 전환은 회복군(SC)에서만 26.2%로 의미있게 높은 빈도로 관찰되었고 (TABLE1) 특히 -308의 polymorphism은 HLA-DRB1*13 양성인 군에서 음성인 군보다 통계적으로 의미있게 높은 빈도로 관찰되었다(44.4% vs. 7.1%; $p < 0.001$). 한편 -238 부위의 G→A 전환은 네 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. (UE; 5.0%, SC; 14.3%, NP; 10.6%, PG; 6.3%) (TABLE 4)

과거 연구보고결과와 달리 TNF- α 유전자 Promoter -308 부위의 G → A 전환은 TNF- α 매개기전에 의한 B형 간염 바이러스의 clearance와 관련이 있을 것으로 생각되나 -308 부위의 polymorphism은 HLA-DRB1*13과 의미있는 유전적 상관성을 보여 향후 이 HLA locus와 B형 간염 바이러스의 clearance간의 상관관계에 대한 확인이 필요하다.

나. HLA DR genotyping

HLA-DRB1*13과 HBV 감염회복과 관련성이 있음은 인종적 차이와 관계없이 이미 확인된 바 있다. UE와 SC군은 HLA-DRB1*13 phenotyping 양성으로 확인된 대상자의 보관된 DNA에서 HLA-DR genotyping을 실시하였으며 NP와 PG군은 새로이 ELPHA DRB Typing Kit (Biotest, Germany)를 사용하여 genotyping을 실시하였다. 분석결과 UE군에서 HLA-DRB1*1301 13%(4/23), *1302 66.7%(16/23), *1303 9.5%(2/23), *1305 4.8%(1/23)이었으며, SC군에서는 *1301 15.2%(8/47), *1302 69.6%(32/47), *1303 6.5%(3/47), *1305 8.7%(4/47)로서 양군간에 의미있는 유전자형의 분포 차이는 관찰할 수 없었다.

TABLE-1 The association of TNF- α promoter gene polymorphism and various stages of HBV infection

TNF- α promoter polymorphism	UE (n=60)	SC(n=84)	NP (n=66)	PR(n=160)
-308 G/G	53(88.3%)	62(73.8%)	64(97.0%)	149(93.1%)
G/A	7(11.7%)	22(26.2%)	2(3.0%)	11(6.9%)
		p<0.01		
-238 G/G	57(95.0%)	72(85.7%)	59(89.4%)	150(93.7%)
G/A	3(5.0%)	12(14.3%)	7(10.6%)	10(6.3%)

TABLE-2. The association of HLA-DR B1*13 and various status of HBV infection

HLA-DR B*13	UE (n=60)	SC(n=84)	NP (n=66)	PR(n=159)
negative	47 (78.3%)	62 (78.6%)	50 (96.2%)	147 (92.5%)
positive	13 (21.7%)	18 (21.4%)	2 (3.8%)	12 (7.5%)

다. Mannose Binding Lectin gene의 돌연변이와 B형 간염 바이러스에 의한 간 질환과의 관계 규명

B형 간염에 노출되지 않은 군(UE) 38예, B형 간염에 감염되었다 회복된 군(SC; HBsAg:-, Anti-HBc:+, Anti-HBs:+) 56예, e항원 음성 만성 보유자군(NP; HBsAg:+, HBeAg:-, 혈청 transaminase: 정상) 48예, 만성 B형 간염, B형 간염으로 인한 간경변 및 간암 등을 포함한 진행성 질환군(PG) 131예 등 총 273예를 대상으로 환자의 혈액에서 DNA를 추출한 후, TNF-a와 같은 방법으로 codon54 부위의 mutation을 관찰하였음. 연구결과 codon54 부위의 G→A 전환은 UE 34.2%, SC 31.3%, NP 31.3%, PG 33.3%로 네 군간의 통계적 유의한 차이가 없었음. 기존의 연구에 의하면 codon54 부위의 G→A 전환이 HBV disease progression과 관계가 있다고 보고된 바있으나 우리의 실험 결과에서는 이를 관찰할 수 없었음. 이것은 인종적 차이와 지역적 차이에 의한 것으로 추정되었다 (Table 3).

라. 간암 발생 가족내 가계도와유전적요인의 관련성에 관한 연구

HBsAg 양성 간암 환자 중 -238 부위의 TNF-a promoter polymorphism이 있는 환자에서 가족 내 HBV 보유율과 간암 발생율, 부모의 HBV 보유율이 상대적으로 비교적 높은 경향을 보여 HBV 간염에 대한 유전적 감수성과 연관성이 있을 거라 여겨진다.

마. HBV의 감염 후 경과에 영향을 주는 Host의 면역유전학적 요인의 규명 및 주요 관련 유전자 발굴

후보유전자의 하나로 우리는 Chemokine receptor(CCR5)의 polymorphism을 조사 하였다.그 결과 CCR5의 promoter 59029의 G/G homozygote가 B형 간염 바이러스의 clearance와 관련이 있는 것으로 나타났다. (SC 35.7%,p<0.05)

Table 3. The association of MBL gene mutation among various stages of HBV infection

MBL codon 54 Mutation	UE (n=38)	SC(n=56)	NP (n=48)	PR(n=131)
G/G	25(65.8%)	37(66.1%)	33(68.8%)	93(71.0%)
G/A or G/A	13(34.2%)	19(31.3%)	15(31.3%)	38(29.0%)

Table 4. The correlation between TNF- α promoter gene polymorphism/ MBL gene mutation and HLA-DR B1*13

HLA-DR B1*13	TNF- α promoter polymorphism		MBL codon 54 mutation	
	G/G n=310	G/A n=45	G/G n=180	G/A A/A n=78
Negative	288(92.9%)	25(55.6%)	169(93.9%)	67(85.9%)
Positive	22(7.1%)	20(44.4%)	11(6.1%)	11(14.1%)
	p<0.001		p=0.034	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

HLA genotyping 결과 DR 1301, 1302의 genotype이 HBV clearance 와 밀접한 유전형이 확인되었고 HLA class I 과 TNF- α promotor gene의 polymorphism에 대한 연구를 수행하여 괄목할 결과를 달성하였다. 그러나 병의 진행과 관련된 후보 유전자는 확인 안된 상태이다. 유전적 요인 확인 위한 간암 가족의 검체확보는 계속 진행중이여서 앞으로의 좀더 많은 연구를 수행하는데 보탬이 될 수 있도록 하였다. MBL gene의 간 질환 및 HBV 감염 단계별 mutation 조사는 TNF- α 부위의 polymorphism과의 연관성 조사와 마찬가지로 수행하였으나 disease와의 유의성은 관찰되지 않았다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 B형 간염의 진행으로 인한 간암 발생에서 면역유전학적 요인을 확인한 연구로 지금까지 이에 관련 연구가 전 세계적으로 극히 미흡한 상태로 단기간에 잘 계획된 임상자료를 확보하여 B형 간염 바이러스 제거에 HLA-DR과 TNF- α promoter 부위의 polymorphism과의 상관관계를 밝힌 점은 B형 간염과 immunogenetics의 관련성을 밝혀준 매우 중요한 연구 결과로 높이 평가된 바 있다.

B형 간염에서 항바이러스 치료제 개발이 활발한 현 시점에서 치료반응이 다른 점과 치료반응을 예측하는 데 활용가능하며 병의 진행을 예측하는데도 본 연구결과가 유용하게 활용될 가능성이 매우 높다.

향후 병의 진행에 직접 영향을 주는 관련 후보 유전자 탐색의 지속적 추가 연구가 필요하며 이를 위한 유전자 screening이 필요하며 아울러 간암 발생 가족내에서 유전적 다형성의 연구조사가 필요하도 생각되어진다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 참고문헌

1. Guidotti et al. *Immunity* 4:25, 1996
2. Wilson et al. *J Exp Med* 177:557, 1993; DAlfonso et al. *Immunogenetics* 39:150, 1994
3. Wilson et al. *Br J Rheumatol* 33:89, 1994
4. Czaja et al. *Gastroenterology* 117:645, 1999
5. Bernal et al. *J Hepatol* 30:237, 1999
6. Hohler et al. *Clin Exp Immunol* 111:579, 1998).
7. Thursz et al. *NEJM* 332:1065, 1995; Hhler et al. *J Hepatol* 26:503, 1997)
8. Thomas *et al.*, *Yhe Lancet* 1996; 348: 1417-1419
9. Yuen *et al.*, *Hepatology* 1999; 29: 1248-1251
10. Matsushita *et al.*, *J. of Hepatology* 1998; 695-700. Matsushita *et al.*, *Arch Virol.* 1998; 143: 645-651
11. Wilson et al. *J Exp Med* 177:557, 1993; DAlfonso et al. *Immunogenetics* 39:150, 1994
12. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274
13. Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association Between Hepatitis B Virus Infection and HLA-DR Type in Korea. *Hepatology* : 1371-1373, 2000
14. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;117:645-652.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서(I)

사업명	중사업명	21C 프론티어연구개발사업		
	세부사업명	인간유전체기능연구사업		
과제명		바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석		
연구기관	한국생명공학연구원	연구책임자	임 동 수	
총연구기간		01년. 1월. 1일. ~ 03년. 6월. 1일. (30개월)		
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	1,070,000		1,070,000	
기술분야		생명과학		
참여기업				
공동연구기관		연세대학교 의과대학		
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용(√)
	5. 선행 및 기 초연구(√)	6. 기타목적활용 (교육연구)(√)	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2003년 7월 15일

연구책임자 : 임 동 수 (인)
연구기관장 : 양 규 환 (직인)

과학기술부장관 귀하

연구결과 활용계획서(I)

1. 연구목표 및 내용

간염 바이러스들 (HCV, HBV)에 의한 간암 발생에 관련된 유전자군을 발굴하고 이들의 기능 분석을 통해 간암의 발생기전을 규명함으로써 간암 진단 및 치료법 개발에 유용하고, 특허권을 주장할 수 있는 바이러스성 간암관련 신규 기능성 유전자군 소재를 도출하는 데에 최종목표를 둔다. 이를 위한 세부 연구개발의 최종목표는 다음과 같다.

- HCV의 발암성 유전자가 도입된 아데노바이러스 유전자 전달체를 이용한 HCV유전자 산물에 의해 조절되는 간암 관련 세포인자의 발굴 및 기능 규명
- 간암유발 바이러스 단백질군과 상호결합하는 숙주 세포단백질군의 체계적인 발굴 및 기능규명
- HBV에 의한 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴
- HBV 전사 활성인자 X에 의한 숙주 세포의 apoptosis를 나타내는 조건을 HBx 유도성 발현 세포주를 이용하여 확립하고, Retrovirus cDNA expression cloning방법을 활용하여 HBx에 의한 세포사멸관련 유전자군을 발굴하고 그 기능을 규명
- HBV 감염시 HBV제거에 관여하는 특정유전형 (HLA Class II DR genotyping)을 확인
- B형 간염 진행과 관련된 유력 유전자 검색을 위한 임상시료를 전향적으로 확보(조기 seroconversion 후 inactive status 환자와 간염의 지속적 진행형 환자의 sample 채취보관)
- HBV 감염 진행으로 간암유발과 관련성 있는 후보유전자를 검색

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 세포사멸을 유도시키는 방법 및 이 방법을 이용하여 세포사멸 억제 물질 및 유전자를 탐색하는 방법	10-2003-00076 91	2003. 2. 7	김연수 외 7명 (한국생명공학연구원)	한국	
METHOD FOR INDUCING THE COMPLETE APOPTOSIS OF LIVER CELLS EXPRESSING PROTEIN HBx AND SCREENING DRUG AND GENE FOR INHIBITING APOPTOSIS			상동	PCT 출원 중	

나. 프로그램 등록목록: 해당사항 없음

다. 노하우 내역: 해당사항 없음

라. 발생품 및 시작품 내역: 없음

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제 목	게재연 월일	호	발행기관	국명	SCI계 재여부
J Virol	The arginine1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1	2001년9 월	75권 12호 8031- 8044	미국미 생물학 회	미국	SCI
J Biol Chem	PRMT5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family	2001년 4월 6일	276 권 14호 11393 -1140 1	미국생화 학-분자 생물학회	미국	SCI
Biochem Biophys Research Comm	Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alterations of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex.	2002년 8월 30일	296; 1005- 1012	Elsevier Inc.	미국	SCI
Mol Cellular Endocrinol	Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249.	2003년 5월 30일	203(1- 2):51- 63.	Elsevier Inc.	미국	SCI
FEBS Letters	PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells.	2003년 6월 19일	545(2- 3):203 -208.	European Biochemi- cal Societies	Den mark	SCI
J Med Virol	Evolution of Hepatitis B Virus Sequence from a Liver Transplant Recipient with Rapid Breakthrough despite Hepatitis B Immune Globulin Prophylaxis and Lamivudine Therapy	2003년 accepted			미국	SCI
J Gastro Hepato	Immunogenetics of hepatitis B virus infection.	2002년 12월		아시아태 평양간학 회		SCI
Atheroscler Thromb Vasc Biol	Upregulation of interleukin-8 by low-density lipoprotein via H ₂ O ₂ , p38 kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells	in revision		미국심장 학회	미국	SCI
Biotechnol Letters	Functional overexpression of the Stm1 protein, a yeast G-protein-coupled receptor, in <i>S.pombe</i>	2003년 2월	25 권; 267-2 72	Kluwer Academi c Publishe r	네덜 란드	SCI
계: 9 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제 목	계재연월일	호	발행기관	국명
8th International Symposium on Hepatitis C virus & Related viruses	The arginine1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1	2001년 9월 2일-5일			프랑스
제13회 한국분자세포생물학회(추계)	NS3 Protein methylation of HCV	2001년 10월			한국
한국유전체학회	Search for and functional analysis of cellular factors modulated by NS5A protein of hepatitis C virus	2002년 8월			한국
한국생화학학회(추계)	Arginine methylation of the NS3 protein of hepatitis C virus and its biological implication	2002년 10월			한국
International Symposium on HBV and Hepatocellular carcinoma	PTEN modulate HBx-induced survival signaling in liver cell.	2002년 9월 29일 ~ 10월 3일			미국
“	The HBx gene product produces ROS.	“			“
“	HBx downregulates IGFBP-3 by recruiting HDAC1.	“			“
“	Mitochondrial injury, oxidative stress, sensitization of mitochondrial membrane potential and deregulated gene expression in mitochondria.	“			“
2003 겨울 모임, 용평리조트	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) and super oxide (O ²⁻) play different roles in human vascular smooth muscle cells (VSMCs) activated by native low density lipoprotein (주제발표 III-I)	2003년 2월		한국분자세포생물학회	한국
추석 학술대회, (KAIST)	Native LDL induces cell proliferation and production of a cytokine in human vascular smooth muscle cells (hVSMC) (Graduate Colloquium # GC2-4)	2002년 10월		한국생화학학회	한국
계: 10 건수					

3. 연구성과

- HCV의 NS5A에 의해 그 발현이 조절되는 5개의 후보유전자를 발굴하고, 이중 1개의 유전자의 발현조절기전연구를 통하여 새로운 HCV의 host metabolism shut off기전을 제안
 - HCV의 core에 의해 발현이 조절되는 3개의 후보유전자를 발굴
 - HCV의 NS3와 세포인자와의 결합이 HCV persistence와 관련되어 있음을 처음으로 규명
 - HCV의 NS5A과 결합하는 19개의 숙주세포에 존재하는 단백질군을 성공적으로 발굴
 - HBX 결합 신규유전자 Histone deacetylase1은 많은 세포에서 히스톤의 acetylation과 deacetylation을 통해 전사활성 조절에 관여하는 중요 단백질의 하나로서 이 단백질이 HBX와 상호작용을 한다는 사실은 본 연구진에 의해 최초로 밝혔음
 - 세계 최초로 HBx 특이적 사포사멸을 100% 유도하는 방법을 구축완료
 - 최초로 HBx에 의한 인체 간세포의 사멸이 ROS에 의한 것이라는 사실을 규명하고, cDNA microarray 방법을 이용하여 관련 유전자들을 발굴
 - B형 간염의 진행으로 인한 간암 발생에서 면역유전학적 요인을 확인한 연구로 지금까지 이에 관련된 연구가 전세계적으로 극히 미흡한 상태로 충분한 대조군을 바탕으로 얻어진 우수한 연구결과로 아시아인에서 면역 유전적 요인이 관여된다는 점을 처음으로 확인하였음
- 이러한 연구결과들을 바탕으로 SCI등재 논문 9건 및 국내외 학술회의에 10건을 발표하고 특허를 1건 출원하였음. 기술이전은 아직 없으나 추가연구를 통하여 가능할 것으로 보임.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 과제 참여 연구자들은 기술이전이 가능한 실용적인 연구성과물을 가시화하기 위해 2 단계 인간유전체기능연구사업 (2003. 7.-2006. 6) 및 2003년도 국책연구개발사업(시스템생물학연구사업)을 통한 계속 연구를 추진하고, 1 단계에서 출원한 특허는 PCT 출원 후 라이선싱 아웃을 추진함.

나. 활용방법

HCV의 NS5A, NS3단백질과 결합하는 세포인자의 발굴 및 이들간의 결합의 생물학적 의미 규명과 HCV의 NS5A, core 단백질에 의해 그 발현이 영향을 받는 세포인자의 발굴은 HCV의 증식기전과 HCV에 의한 간암발생기전을 분자수준에서 해석할 수 있게 함. 본 연구를 통하여 새로이 밝혀진 HBX 결합 신규유전자 Histone deacetylase1 (HDAC1)이 HBX와의 상호작용을 통해 암 억제 유전자 IGFBP-3의 발현을 억제한다는 사실은 본 연구진에 의해 최초로 밝혀졌으며, 계속 진행되고 있는 상호작용 기작에 관한 연구는 간암 생성 기작의 중요한 단계를 이해하는 핵심적인 역할을 할 것으로 사료됨. 더불어 Apoptosis 및 anti-apoptosis 유발 유전자군의

발굴 및 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴 결과는 B형 간염 바이러스성 간암의 생성 기작을 이해하는데 중요한 기반이 될 것이며, HBV 이외의 여러 다른 바이러스의 세포 내 작용 기전에 관한 연구 방향에도 새로운 단서를 제공할 것으로 기대됨. C형 간염환자는 국내외적으로 약 1억7천만 명으로 추정되고 있고, 백신 및 효과적인 치료제가 없으며, 이에 기인하는 간암의 치료기술개발이 절실히 요구되는 현 상황에서 이러한 결과들은 발암기능을 조기에 차단하는 치료제와 간암예방기술의 개발에 활용하며, chemical genomics 등을 이용한 HTS(high throughput screening)에 표적분자로 이용되어 바이러스성 간암 치료제 개발에 활용함. B형 간염에서 항바이러스 치료제 개발이 활발한 현 시점에서 치료반응이 다른 점과 치료반응을 예측하는 데 활용하며 병의 진행을 예측하는 데에 활용함. 발굴된 HBx-mediated apoptosis 관련 유전자들의 세포 내 발현을 동력학적으로 분석하여 생명현상을 시스템 관점에서 분석하고 이를 근거로 질병 발생 상황을 simulation 할 수 있는 시스템 개발에 활용.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

1 단계에서 얻어진 결과들은 바이러스성 간암을 효과적으로 제어할 수 있는 기초정보를 제공하는 것으로서 이에 대한 추가연구를 2단계 인간유전체 기능연구사업 (2003. 7- 2006. 3) 및 2003년도 국책연구개발사업을 통해 추진하여 실용적인 연구성과물이 얻어질 경우 향후 7년 후에 기술이전 혹은 산업화를 추진하며, 1 단계에서 특허출원된 기술은 라이선싱 아웃을 추진함.

5. 기대효과

(1) 기술적 효과

- C형 간염 환자는 전세계적으로 약 1억 명이상이고, HCV간염을 예방할 수 있는 백신이 개발되어 있지 않고, 이에 대한 효과적인 치료제가 여전히 개발되지 않은 상황에서, HCV의 NS5A에 의해 그 발현이 조절되는 유전자의 발현조절기전연구를 통하여 새로운 HCV의 host metabolism shut off기전을 제안하였고, HCV의 core에 의해 간암발생과정을 분자세포수준에서 이해할 수 있었으며, HCV의 NS3와 세포인자와의 결합이 HCV persistence와 관련되어 있음을 처음으로 규명하였고, NS5A와 결합하는 세포인자들을 발굴하여 HCV의 간암 치료기술개발을 촉진하는 데에 기여하였음
- B형 간염 환자는 전 세계적으로 4억명, 국내에만도 300여만 명이 있는 것으로 추정되고 있으며, 국내외적으로 항 바이러스 시장이 높은 관심을 끌고 있음. HBX 단백질과 결합하여 바이러스의 증식과 암 형성에 중요한 역할을 하는 표적 분자를 밝혀낸 것과 HBX 단백질에 의한 세포주기와 apoptosis 관련 유전자의 발굴은 바이러스의 작용 기전에 대한 이해를 통해 표적분자의 저해제 등을 이용한 신약 개발 등의 가능성을 시사함. HBX 단백질이 핵 내에서 HDAC1과의 상호작용을 통해 목표 유전자의 전사 활성을 조절한다는 새로운 연구 결과와 Apoptosis

및 anti-apoptosis 유발 유전자군의 발굴 및 세포주기 변이 관련 유전자의 발굴 결과는 B형 간염 바이러스성 간암의 생성 기전을 이해하는데 중요한 기반이 되는 것이라 할 수 있음. 또한 HBV의 세포 내 유전자 조절 메커니즘에 관한 이번 연구 성과는 항바이러스제의 개발 등에 새로운 연구 방향을 제시할 수 있을 것으로 기대됨.

- 질병과 관련된 생명현상을 시스템 수준에서 조사 예측할 수 있는 모델시스템으로 사용할 수 있어 이 분야 연구 발전에 기여를 할 수 있음.
- 간염/간암의 발생을 활성산소 측면에서 규명하여 새로운 예방 및 치료제 개발에 이용할 수 있음.

(2) 사회·경제적 파급효과

- 간염 및 간암의 예방 및 치료기술 개발을 통하여 이 질병으로 인해 파생되었던 막대한 사회 경제적 지출을 감소시킬 수 있음
- 1 단계에서 얻어진 연구결과들이 추가 연구를 통하여 실용화될 경우 전 세계적으로 바이러스성 간암환자 수 (HCV 1억 명 이상, HBV 4 억명이상)를 고려하고, 현재 효과적인 간암치료제가 없어 2000년도에만 간암으로 인하여 전세계적으로 약 56만 명이 사망하였다는 사실을 고려하면, 예상 매출액은 향후 수천억원이 예상됨.
- 추가 연구를 통하여 수십명의 연구인력 고용창출을 유발할 수 있으며, 실용화가 가능한 연구 성과가 향후 7년후에 발생할 경우 보건의료산업의 활성화에 기인하여 수 천명의 신규 고용인력이 창출될 수 있을 것으로 보임.
- 과학기술의 질적, 양적 측면에서 한국을 선진국 대열에 진입시킬 수 있음

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

없음

【첨부2】 -기술요약서(최종보고서 첨부)

기술 요약서

■ 기술의 명칭

HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 세포사멸을 유도시키는 방법 및 이 방법을 이용하여 세포사멸 억제 물질 및 유전자를 탐색하는 방법 (METHOD FOR INDUCING THE COMPLETE APOPTOSIS OF LIVER CELLS EXPRESSING PROTEIN HBx AND SCREENING DRUG AND GENE FOR INHIBITING APOTOSIS). 한국특허출원번호: 0-2003-0007691/PCT 출원중. 특허출원일자: 2003년 2월 7일. 발명자 (출원인): 김연수 외 7인. 특허출원기관: 한국생명공학연구원.

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	(사업단 과제관리 시스템에서 부여된 번호 기입)			
과제명	바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석 (Retroviral cDNA expression library/Proviral tagging을 이용한 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 분석분야)			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	정부 출연연구소	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001. 01. 01. - 2003. 06. 30.			
총연구비	정부(1,070,000)천원 민간(0)천원 합계(1,070,000)천원			
연구책임자 1	성명	김연수	주민번호	580710-1042218
	근무기관 부서	한국생명공학연구원. 단백질기능연구실	E-mail	kimys@kribb.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	042 860 4270
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	김연수	소속/부서	한국생명공학연구원. 단백질기능연구실
	직위/직급	책임연구원	E-mail	kimys@kribb.re.kr
	전화번호	042 860 4270	FAX	042 860 4593
	주소	(305-333) 대전시 유성구 어은동 52		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

본 기술은 B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)의 유전자 중 간암 유발 인자로 알려진 X 유전자(HBx)가 발현되는 간세포의 사멸을 세포 배양 상에서 유도시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 NF- κ B 억제제를 단독 또는 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 유도제와 동시에 처리하는 방법을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 기술은 상기 세포사멸 유도 방법들을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자를 탐색하는 시스템에 관한 것이다.

<기술적 특징>

- (1) BT관련 무공해 첨단기술

[용도·이용분야]

- (1) 간염치료제 탐색 발굴
- (2) 간염 유전자치료제 후보 유전자 탐색 발굴
- (3) 간염/간암 예방 신약 탐색 발굴

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술 : 없음

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호				
과제명	바이러스성 간암관련 신규 유전자 발굴 및 기능 분석 (Retroviral cDNA expression library/Proviral tagging을 이용한 바이러스성 간암 관련 신규 유전자 발굴 분석분야)			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	정부출연연구소	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001. 01. 01. - 2003. 06. 30.			
총연구비	합계 : (1,070)백만원 - 정부 : (1,070)백만원 민간 : (0)백만원			
연구책임자	소속	한국생명공학연구원	성명	김연수
	전화번호	042-860-4270	E-mail	kimys@kribb.re.kr
연구개발 주요내용				
<p>본 기술은 B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)의 유전자 중 간암 유발 인자로 알려진 X 유전자(HBx)가 발현되는 간세포의 사멸을 세포 배양 상에서 유도시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 NF-κB 억제제를 단독 또는 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 유도제와 동시에 처리하는 방법을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 완전한 사멸을 유도시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 기술은 상기 세포사멸 유도 방법들을 이용하여 HBx 단백질을 발현하는 간세포의 사멸을 억제하는 물질 및 유전자를 탐색하는 시스템에 관한 것이다.</p>				