

## 조류독감바이러스유전자 *PB2*에 대한 인공miRNA선구체 구조들의 열역학적안정성에 따르는 유전자침묵효과

신연삼, 강정규

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487~488페이지)

현시기 생명과학의 기초연구뿐만아니라 암치료나 항바이러스연구 등에 RNA간섭기술이 광범히 리용되고있다. 특히 천연miRNA들의 발견과 그에 대한 연구가 심화됨에 따라 그를 모방하는 인공miRNA(AmiRNA)기술개발이 생명과학의 첨단분야의 하나로 등장하고있다.[4, 8, 9] 여기서 AmiRNA줄기고리구조의 합리적인 설계는 miRNA가공이나 그후의 RNA간섭에 영향을 주어 간섭효율을 증가시킬수 있다.[4]

우리는 천연miRNA의 배열특성[3]과 고유한 2차구조적특성[3]에 대한 선행연구결과에 기초하여 miRNA의 선발기준을 확립하고 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR영역을 표적으로 하는 가장 합리적인 AmiRNA배열을 탐색[2]한데 기초하여 AmiRNA선구체구조들의 합리적인 설계를 목적으로 그것들의 열역학적안정성에 따르는 유전자침묵효과와  $\beta$ -인터페론의 유발특성을 보았다.

### 재료 및 방법

조류독감바이러스유전자 *PB2*(3'-UTR포함)의 단독발현운반체 및 Luc-*PB2*(3'-UTR포함)융합단백질발현운반체의 재조합 루씨페라제알림유전자의 발현운반체를 재조합하기 위하여 반디벌레 루씨페라제유전자가 클론화된 pGL3(《Promega》)운반체로부터 루씨페라제유전자를 증폭하여 진핵발현운반체인 pCMV-Tag2의 *Hind* III, *Eco*R I제한효소절단부위에 클론화하였다. 외원성유전자의 ORF뿐만아니라 3'-UTR에 있는 표적배열에 대한 인트론성AmiRNA의 유전자침묵효과를 조사할 목적으로 조류독감바이러스유전자 *PB2*(3'-UTR포함)가 클론화되어있는 pMD18-T 운반체(유전자는행번호 EU329174)로부터 *PB2*유전자를 증폭하여 pCMV-Tag2의 *Hind* III, *Eco*R I제한효소절단부위에 삽입하는 방식으로 *PB2*(3'-UTR포함)유전자발현운반체를 제작하였다. 한편 *PB2*유전자발현억제를 알림유전자인 루씨페라제활성으로 조사하기 위하여 위에서 얻어진 루씨페라제유전자와 *PB2*유전자를 중복PCR방법으로 융합하고 우와 같은 운반체에 클론화하여 Luc-*PB2*(3'-UTR포함)융합단백질발현운반체를 얻었으며 배열분석을 통하여 검증하였다.

인트론성AmiRNA발현운반체의 재조합과 표적배열선정 인트론성AmiRNA(splicing pre-miRNA 155-designed miRNA, SM155-miRNA)발현운반체는 선행연구[2]에 준하여 재조합하였으며 목적유전자의 표적배열은 BLOK-iTTMRNAi/miRRNAi를 리용하여 선발하였다. 이 표적배열들에 특이적인 AmiRNA발현운반체는 부착말단과 표적배열에 특이적인 배열을 가진 pre-miRNA 발현용두오리사슬의 올리고DNA(64nt)를 합성하고 아닐링하여 우에서 만든 운반체의 *BsmB*I제한효소절단부위에 연결하는 방법으로 재조합하였다.

열역학적안정성계산 선행연구[1]에서 리용된 miRNA선구체구조들의 열역학적안정성은 프로그램 Vienna RNA Package 1.6의 RNAfold기능[7]을 리용하여 계산하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 서로 다른 줄기 구조를 가지는 AmiRNA들의 유전자침묵효과와 $\beta$ -인터페론유발특성

먼저 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 서로 다르게 설계한 miRNA선구체구조들의 유전자침묵효과와  $\beta$ -인터페론의 유발특성을 비교한 선행연구자료[1]를 리용하여 검토하였다.

그림 1은 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 서로 다르게 설계한 6가지의 선구체구조들을 보여준다.

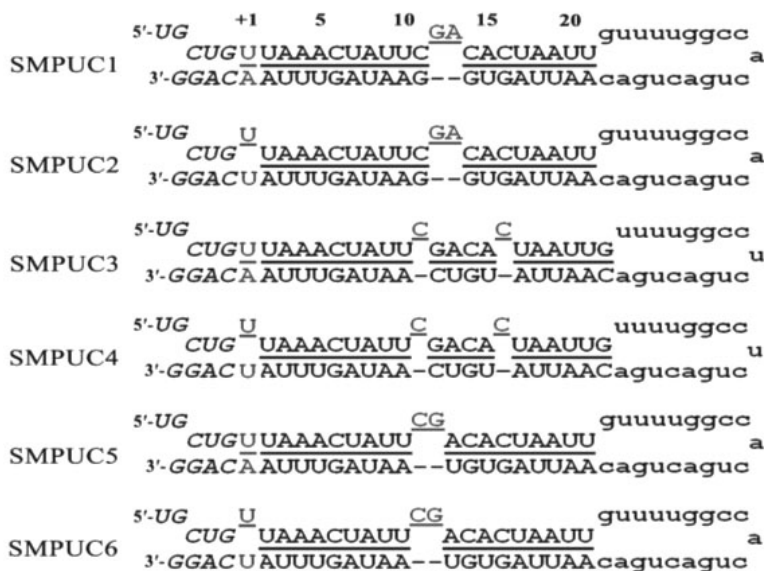


그림 1. 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 설계된 AmiRNA들(SM155-miRNA/*PB2*-3'-UTR-C1-6, SMPUC1-SMPUC6)의 선구체구조  
소문자로 표시한것은 고리구조, 밑선으로 표시한것은 표적mRNA와 상보적인 배열이며 사체로 표시한것은 운반체연결부위임

SMPUC1과 SMPUC3은 작은 루프가 +12, +13위치에 1개, +11, +16위치에 2개가 존재하는 구조이다. 그밖에 +1위치에 오유염기쌍을 가지는 구조(SMPUC2, SMPUC4, SMPUC6)와 +11, +12위치에 작은 루프를 가지는 구조(SMPUC5, SMPUC6)를 설계하고 합성하여 miRNA

발현운반체에 삽입하였다.

그림 2는 293T세포에 *PB2*(3'-UTR포함)유전자발현운반체와 Luc-*PB2*(3'-UTR포함)알림 유전자융합발현운반체와 함께 서로 다른 선구체구조로 설계된 AmiRNA(SMPUC1-SMPUC6)들을 형질감염시키고 48h후에 상대루씨페라제활성과 *PB2*유전자의 상대mRNA발현량을 평가한 결과이다.

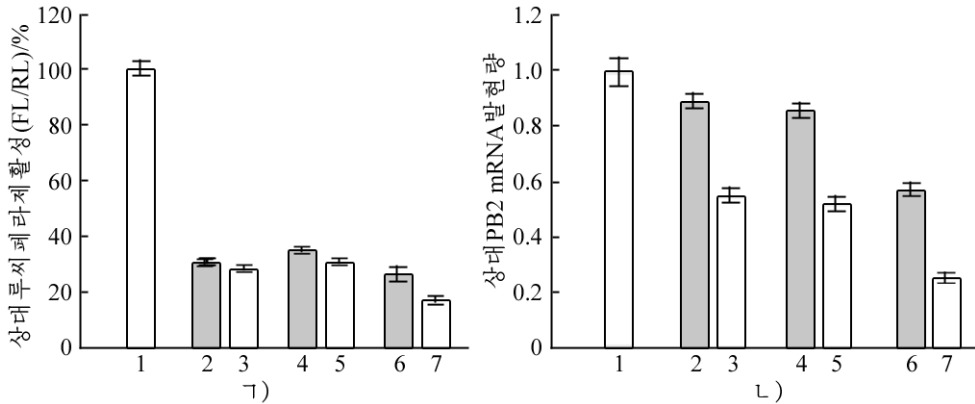


그림 2. 293T세포에서 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 설계된 AmiRNA들의 유전자침묵효과

1) 상대루씨페라제활성, 2) 상대 *PB2* mRNA 발현량

1-대조, 2-7은 서로 다른 선구체구조의 AmiRNA(SMPUC1-SMPUC6), 대조는 물고기비루스 RGV의 53R유전자에 대한 miRNA(SMPUC6과 같은 선구체구조, SM53R)

그림 3은 세포독성검토를 위하여 293T세포에 Luc-*PB2*(3'-UTR포함) 알림유전자융합발현운반체와 *PB2*유전자의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 서로 다른 선구체구조로 설계된 AmiRNA(SMPUC1-SMPUC6)들을 각각 형질감염시키고 48h 후 실시간PCR(RT-PCR)로  $\beta$ -인터페론 mRNA의 상대발현량을 측정 한 결과이다.

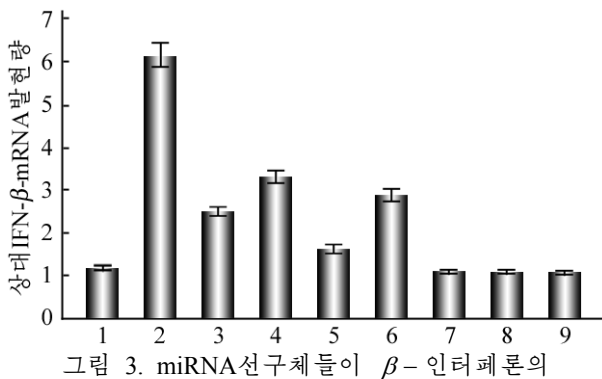


그림 3. miRNA선구체들이  $\beta$ -인터페론의 유발에 미치는 영향

1-대조, 2-7은 서로 다른 선구체구조의 AmiRNA (SMPUC1-SMPUC6), 8-Luc-*PB2*(알림유전자 융합발현운반체), 9-무처리세포

2) 서로 다른 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성과 그에 따르는 유전자침묵효과와  $\beta$ -인터페론유발특성

우리는 위에서 본 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성을 프로그램 Vienna RNA Package 1.6의 RNAfold기능을 리용하여 계산하였는데 그 결과는 표와 같다.

표에서 보는것처럼 SMPUC2, SMPUC4, SMPUC6의 경우에 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성은 SMPUC1, SMPUC3, SMPUC5에 비하여 1번 위치에 오유염기쌍을 가지고있는것으로 하여 상대적으로 열역학적안정성이 낮았다.

표. 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대하여 6가지로 설계된 AmiRNA들의 열역학적안정성

AmiRNA이름	AmiRNA선구체구조의 $\Delta G_0 / (-4.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
SMPUC1	-23.7
SMPUC2	-19.6
SMPUC3	-22.9
SMPUC4	-18.8
SMPUC5	-22.5
SMPUC6	-18.4

진 SMPUC2, SMPUC4, SMPUC6의 경우에 루씨페라제활성은 상대적으로 낮았는데 특히 열역학적안정성이 제일 낮은 SMPUC6의 경우에는 보다 뚜렷하게 낮아졌다.

그림 2의 L)에서 보는바와 같이 +1위치에 오유염기쌍이 없는 miRNA들(SMPUC1, SMPUC3, SMPUC5)가운데서 SMPUC1, SMPUC3에 비해 SMPUC5의 경우에 상대*PB2* mRNA 발현량이 현저히 낮았으며 +1위치에 오유염기쌍을 가진 miRNA선구체구조들가운데서도 SMPUC2, SMPUC4와 비교해볼 때 SMPUC6의 경우 상대*PB2* mRNA발현량이 가장 뚜렷하게 낮아졌다. 즉 열역학적안정성에 따라 상대*PB2* mRNA발현량이 차이났는데 열역학적안정성이 제일 낮은 SMPUC6의 경우에 발현량이 제일 낮았다.

이것은 +1위치에 오유염기쌍을 가지며 +11, +12위치에 작은 루프를 가지는 AmiRNA 선구체구조(SM155-miRNA)가 유전자침묵에 보다 적합할수 있다는것을 보여주는 동시에 AmiRNA설계에서 선구체구조의 열역학적안정성이 매우 중요한 인자라는것을 시사해준다.

그림 2의 Γ)에서 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성에 따르는 mRNA발현량차이에 비해 루씨페라제활성차이가 뚜렷하지 않은것은 각이한 AmiRNA선구체구조들에 의한 세포독성( $\beta$ -인터페론유발)의 결과 비표적mRNA(내재성의 GAPDH나 외래Renilla루씨페라제 유전자)의 발현저해가 차이나는것으로 설명될수 있다.

다음으로 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성에 따르는  $\beta$ -인터페론의 유발특성을 비교하였다.

그림 3에서 보는것처럼 *PB2*유전자의 3'-UTR에 있는 동일한 표적배열에 대한 miRNA 선구체구조(SMPUC1-SMPUC6)들에 의한 인터페론유발은 무처리세포나 음성대조의  $\beta$ -인터페론 mRNA발현량을 대조로 하여 볼 때 SMPUC6의  $\beta$ -인터페론 mRNA발현량이 제일 낮았으며 SMPUC4의 경우에도 비교적 낮은 값을 보여주었다. 또한 AmiRNA선구체구조들사이의 열역학적안정성의 차이에 따라  $\beta$ -인터페론발현량은 크게 차이가 났다.

이러한 실험결과는 miRNA선구체구조의 열역학적안정성이 miRNA에 의한 인터페론유발에서 중요한 역할을 하며 선구체구조의 열역학적안정성이 상대적으로 낮을 때  $\beta$ -인터페론을 더 낮게 유발시킨다는것을 보여주었다.

이처럼 miRNA선구체구조들의 열역학적안정성에 따르는 유전자침묵효과와 인터페론유발특성을 비교한 결과 상대적으로 열역학적안정성이 낮은 miRNA선구체구조가 세포독성을

또한 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성은 +1 위치에 오유염기쌍을 가지며 +11, +12위치에 작은 루프를 가지는 SMPUC6의 경우에 제일 낮았으며 SMPUC4의 경우에도 비교적 낮았다.

다음으로 AmiRNA선구체구조들의 열역학적안정성에 따르는 유전자침묵효과를 비교하였다.

선행연구자료와 비교한 결과 miRNA선구체구조들가운데서 열역학적안정성이 제일 낮은 SMPUC6의 경우에 유전자침묵효과가 제일 높았다.

그림 2의 Γ)에서 보는것처럼 SMPUC1-SMPUC6들이 형질감염된 세포들에서는 대조에 비하여 루씨페라제활성이 현저히 낮아졌으며 1번 위치에 오유염기쌍을 가

가지지 않으면서도 더 높은 유전자침묵효과를 가진다는것을 알수 있다.

조류독감바이러스유전자 *PB2*의 3'-UTR의 동일한 표적배열에 대한 유전자침묵효과에서의 이러한 차이는 miRNA선구체구조들의 열역학적안정성이 성숙miRNA가 정확히 생성되어 3'-UTR에 있는 표적배열이나 그 주변배열 또는 그것들의 2차구조를 비롯한 표적결정인자들과 작용하여 표적부위에 쉽게 접근[5, 6]하거나 보조인자단백질(예하면 Ago단백질)과 miRNP복합체를 형성하는 과정에 관여[4]하기때문이라고 볼수 있다.

## 맺 는 말

AmiRNA선구체구조의 열역학적안정성이 AmiRNA에 의한 인터페론유발에서 중요한 역할을 하며 선구체구조의 열역학적안정성이 상대적으로 낮을 때 세포독성을 가지지 않으면서도 더 높은 유전자침묵효과를 가진다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 57, 10, 151, 주체100(2011).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 58, 8, 142, 주체101(2012).
- [3] 신언삼 등; 생물학, 4, 24, 주체100(2011).
- [4] C. B. Nielsen et al.; RNA, 13, 11, 1894, 2007.
- [5] M. A. Valencia-Sanchez et al.; Genes Dev., 20, 515, 2006.
- [6] M. Kertesz et al.; Nat. Genet., 39, 1278, 2007.
- [7] N. Sugimoto et al.; Biochemistry, 34, 11211, 1995.
- [8] J. Han et al.; Cell, 125, 5, 887, 2006.
- [9] R. L. Bodreau et al.; Mol. Ther., 17, 1, 169, 2009.

주체103(2014)년 9월 5일 원고접수

## Gene Silencing Efficiency of Artificial Microrna against a Target in AIV *PB2* Gene according to Thermodynamic Stability of Pre-miRNA Structures

*Sin On Sam, Kang Jong Gyu*

We studied gene silencing efficiency and  $\beta$ -interferon production according to thermodynamic stability of pre-miRNAs against a target in AIV *PB2* gene. We did thermodynamic calculations of previously used pre-miRNAs using "RNAfold" function of "Vienna RNA Package 1.6".

The investigation of gene silencing effect and interferon response according to thermodynamic stability of pre-miRNAs showed that pre-miRNAs with relatively low thermodynamic stability has no cell toxicity and higher gene silencing effect.

Key words: artificial miRNA, RNA interference, SM155-miRNA