

사람아데노비루스5형에서 발현되는 miRNA가 비루스만성감염증에 미치는 영향

김성일, 한경애, 최문명

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리 나라의 과학기술을 가까운 앞날에 세계선진수준에 올려세우려는것은 우리 당의 확고한 결심입니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 485페이지)

아데노비루스는 2중라선DNA비루스로서 인체내 특히 호흡기계통이나 눈알, 위장계통에 침습하여 여러가지 질병을 일으키는데 이러한 질병은 대체로 만성적인 비루스감염으로 인하여 나타난다.[1]

우리는 사람아데노비루스5형에서 발현되는 비루스miRNA들이 만성감염증에 미치는 영향을 부위특이적갑작변이와 실시간정량PCR를 리용하여 밝힘으로써 비루스만성감염증치료의 실험적기초를 마련하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 및 기구 환자의 편도로부터 채취한 아데노비루스5형을 기본비루스실험재료로 리용하였으며 감염세포로는 사람배아콩팥세포를 리용하였다. PCR는 폴리메라제(《Phusion》)와 PCR장치(《Bio-rad》)를 리용하여 진행하였다. 실시간정량PCR를 위한 장치로는 《Applied Biotechnology》를 리용하였다.

연구방법 우선 부위특이적갑작변이에 의하여 5'-mivaRNA(아데노비루스miRNA)와 3'-mivaRNA에 각각 점갑작변이를 도입[2]하고 정상형과 변이된 miRNA를 발현하는 비루스를 각각 세포에 감염시킨 후 날자별(4, 11, 21, 35, 48일)로 시료를 취하여 DNA를 추출하였다. DNA추출은 트리졸시약을 리용하여 진행하였다.

다음 아데노비루스에서 발현되는 핵산단백질유전자에 대한 반정량PCR를 진행하여 매 시험구에서의 유전자발현정도를 비교하였다. 보다 구체적인 비교를 위하여 TaqmanqPCR시약[3]을 리용한 실시간정량PCR를 진행하였다.

연구 결과

1) 비루스miRNA변이체 생성

아데노비루스miRNA(mivaRNA)는 일반적으로 비루스관련미소RNA(VA RNA)를 전구체로 하여 Dicer라는 절단효소에 의하여 만들어진단. VA RNA의 어느 끝부분에서 절단되는가에 따라서 5'- 혹은 3'-mivaRNA라는 이름을 붙여 부른다.

우리는 갑작변이를 위하여 설계된 프라이머에 의한 PCR에 의하여 아데노비루스5형mivaRNA에 부위특이적갑작변이를 도입하였다.(그림 1)

2) 반정량PCR

DNA를 추출한 후 나노드롭을 리용하여 매 시험구의 DNA농도를 측정 한 후 모두 50ng/μL의 농도로 희석하였다. 다음 프라이머(그림 2)를 리용하여 PCR를 진행하였다.(그림 3) 프라이머는 아데노비루스에서만 발현되는 캡시드단백질인 핵손유전자배열을 증폭하도록 설계하였다. 대비유전자로서 miRNA생성에 참가하는 Dicer 효소를 발현하는 유전자를 리용하였다. 조작상 오류로 하여 48일째 정상형실험재료는 이 반응에 첨가하지 못하였다.

상류프라이머: 5'-GACATGACTTTCGAGGT
CGATCCCATGGA-3'

하류프라이머: 5'-CCGGCTGAGAAGGGTGT
GCGCAGGTA-3'

그림 2. 핵손유전자증폭을 위한 프라이머배열

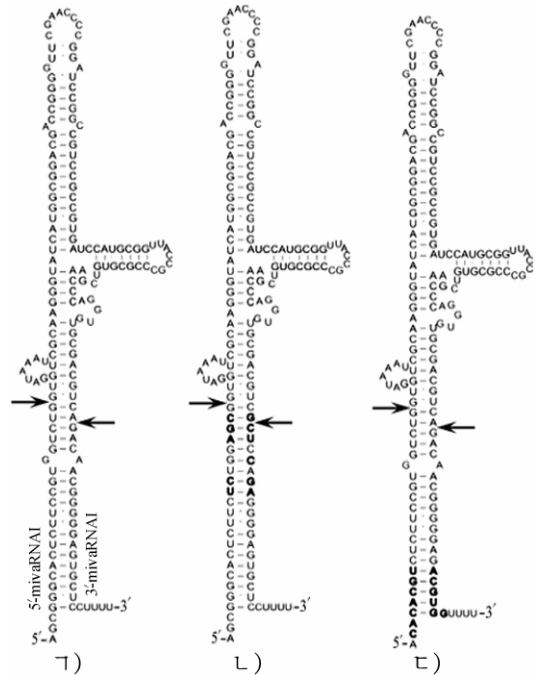
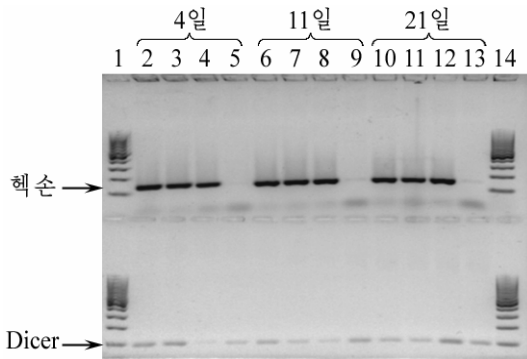


그림 1. 정상형과 변이형아데노비루스 관련미소RNA

1) 정상형, 2) 3'-변이형,
3) 5'-변이형

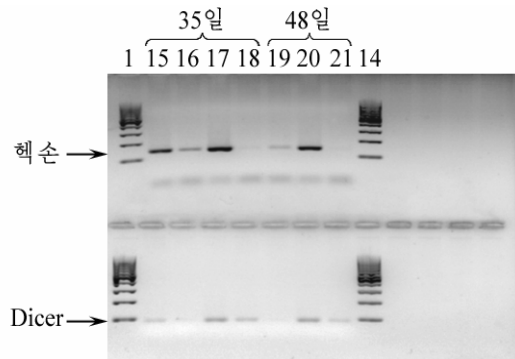


그림 3. 반정량PCR반응산물의 전기영동상

윗부분은 핵손유전자이고 아래부분은 Dicer유전자, 1, 14는 DNA분자량표식자(100bp),
2, 6, 10, 15는 정상형, 3, 7, 11, 16, 19는 3'-변이형, 4, 8, 12, 17, 20은 5'-변이형,
5, 9, 13, 18, 21은 비루스를 감염시키지 않은 시험구

그림 3에서 보는바와 같이 감염 후 첫 3주일동안은 모든 시험구에서 유전자발현이 거의 비슷하였다. 그러나 1달후부터는 비루스유전자발현에서 현저한 차이가 나타났다. 3'-mivaRNA변이형이 발현되는 비루스감염구에서 비루스유전자발현이 줄어든것을 볼수 있다. 이것은 3'-mivaRNA가 감염 후 비루스유전자발현에서 중요한 역할을 한다는것을 암시해 주며 나아가서 비루스만성감염과 직접적인 연관을 가지고있다는것을 보여준다. 더우기 흥미있는것은 대조유전자로 리용한 세포성Dicer유전자의 발현도 억제한다는것이다.

3) 실시간정량PCR(qPCR)

정상형과 변이형에서의 비루스유전자발현정도를 구체적으로 비교하기 위하여 실시간 정량PCR를 진행하였다.(그림 4) 이 실험에서 형광색소표식자는 탐침의 5'—끝에 결합된 FAM색소이며 표준화를 위한 유전자로서 리보자임인 RNase P를 리용하였다.

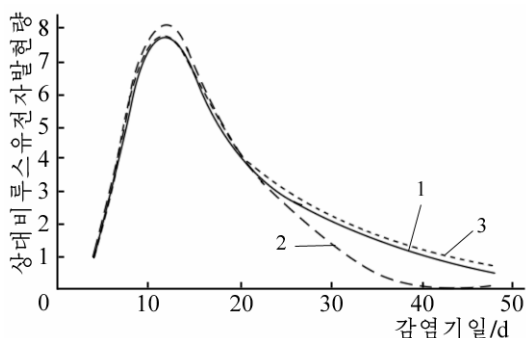


그림 4. 감염기간에 따르는 비루스유전자 발현량을 보여주는 실시간PCR결과
1—정상형, 2—3'—변이형, 3—5'—변이형

그림 4에서 보는바와 같이 3'—변이형에서는 25일이후부터 비루스유전자발현이 정상형 및 5'—변이형과 다르게 줄어들었다. 이 결과로부터 3'—mivaRNA가 비루스만성감염때 비루스유전자의 발현에서 중요한 작용을 한다는것을 알수 있다. 따라서 이 연구결과는 3'—mivaRNA배열을 조절하는 방법으로 아데노비루스만성감염증을 치료할수 있다는것을 보여준다.

맺 는 말

1) 사람아데노비루스5형에서 발현되는 miRNA(mivaRNA)가 비루스만성감염에서 중요한 역할을 하며 특히 3'—mivaRNA가 결정적인 역할을 한다.

2) 비루스miRNA가 비루스유전자뿐만아니라 감염된 세포에서의 유전자발현에도 영향을 미친다.

참 고 문 헌

- [1] H. S. Ginsberg; Virology, 18, 312, 1962.
- [2] W. Kamel et al.; Nucleic Acids Res., 41, 4802, 2013.
- [3] Matt Cottrell et al.; qPCR Protocol I: ABI Instrument. 2014.

주체105(2016)년 10월 5일 원고접수

Effect of mivaRNAs on Human Adenovirus Type 5 Persistence Infection

Kim Song Il, Han Kyong Ae and Choe Mun Myong

We made an evidence suggesting that the mivaRNAs may have a significant effect on the establishment/maintenance of a persistent virus infection. Especially, 3'—mivaRNA has a critical role in virus genome replication.

In addition to virus genome, mivaRNA can affect the gene expression in the host cell.

Key words: Ad5, miRNA, persistent virus infection