

## 조류독감바이러스유전자 *PB2*의 서로 다른 위치의 표적에 대한 단일 및 다중발현인공microRNA들의 유전자침묵효과

신연삼, 김유신, 림래근

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 유전자기능연구와 암치료, 항바이러스연구에 인공microRNA(AmiRNA)에 의한 RNA 간섭기술이 광범히 적용되고있으며 특히 에이즈, 조류독감을 비롯한 질병바이러스들을 막기 위한 연구에 이 기술이 적극 적용되고있다.[5-7, 9]

우리는 유전자침묵효과가 높으면서도 인터페론- $\beta$ 의 유발이 적은 인트론성AmiRNA를 설계[1-4, 8, 10]한데 기초하여 293T세포에서 조류독감바이러스증식에 필수적인 유전자들인 *PB2*과 *NP*를 표적으로 하는 단일 및 다중발현AmiRNA의 침묵효과를 연구하였다.

### 재료 및 방법

조류독감바이러스유전자 *PB2*(3'-UTR 포함)의 단일발현운반체 및 Luc-*PB2*(3'-UTR 포함)융합단백질발현운반체의 재조합 루씨페라제알림 유전자의 발현운반체를 재조합하기 위하여 반디벌레 루씨페라제유전자가 클론화된 pGL3(《Promega》)운반체로부터 루씨페라제유전자를 증폭하여 진핵발현운반체인 pCMV-Tag2의 *Hind* III, *Eco*R I제한효소절단부위에 클론화하였다. 외원성 유전자의 ORF뿐 아니라 3'-UTR에 있는 표적배열에 대한 인트론성AmiRNA의 유전자침묵효과를 조사할 목적으로 조류독감바이러스유전자 *PB2*(3'-UTR 포함)가 클론화되어있는 pMD18-T 운반체(유전자는행번호 EU329174)로부터 *PB2*유전자를 증폭하여 pCMV-Tag2의 *Hind* III, *Eco*R I제한효소절단부위에 삽입하는 방식으로 *PB2*(3'-UTR 포함)유전자발현운반체를 제작하였다. 한편 *PB2*유전자발현억제를 알림 유전자루씨페라제활성으로 조사하기 위하여 우에서 얻어진 루씨페라제유전자와 *PB2*유전자를 증폭PCR방법으로 융합하여 우와 같은 운반체에 클론화함으로써 Luc-*PB2*(3'-UTR 포함)융합단백질발현운반체를 얻었으며 배열분석을 통하여 검증하였다.

인트론성AmiRNA발현운반체의 재조합과 표적배열선정 인트론성AmiRNA(splicing pre-miRNA155-designed miRNA: SM155-miRNA)발현운반체는 선행연구[1]에 준하여 재조합하였으며 목적

유전자의 표적배렬은 BLOK-iTTMRNAi/miRNAi를 리용하여 선발하였다. 이 표적배렬들에 특이적인 AmiRNA발현운반체는 부착말단과 표적배렬에 특이적인 배렬을 가진 pre-miRNA 발현용두오리사슬의 올리고DNA(64nt)를 합성하고 아닐링하여 우에서 만든 운반체의 BsmBI제한효소절단부위에 연결하는 방법으로 재조합하였다.

세포배양과 형질감염, 루시페라제활성측정 형질감염용세포로는 293T세포를 리용하였으며 정제한 플라즈미드를 Lipofectamine 2000(《Gibco-Invitrogen》)으로 형질감염시켰다.

루씨페라제 활성측정은 세포형질감염 48h후에 세포를 수집하고 활성측정시약키트와 장치를 리용하여 FL(Firefly luciferase)과 RL(Renilla luciferase)활성비를 계산하는 방식으로 진행하였다.

실시간정량RT-PCR(Real-time quantitative RT-PCR)방법 실시간정량RT-PCR은 293T세포에서 형질감염 48h후 총RNA를 분리하고 역전사반응시약키트를 리용하여 cDNA로 전환시킨 다음 해당한 프라이머와 전문측정시약키트, 장치를 리용하여 진행하였으며 상대mRNA발현량은 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)유전자를 표준유전자로 하여  $\Delta\Delta Pfaffl$  법으로 계산하여 비교분석하였다.

## 결과 및 논의

1) 조류독감바이러스유전자 *PB2*와 *NP*의 표적배열들에 대한 SM155-miRNA의 선구체구조설계  
조류독감바이러스유전자 *PB2*와 *NP*(5'-UTR와 3'-UTR를 포함)를 표적으로 하는 AmiRNA,  
SM155-miRNA의 배열은 BLOK-iTTMRNAi/miRRNAi(<http://rnaidesigner.invitrogen.com>)를 통하  
여 표적배열을 선발하고 새롭게 설계된 줄기구조(+1위치에 오유염기쌍이 있고 +11, +12위  
치에 작은 고리가 있는)[1, 2]를 가진 pre-miRNA를 설계하는 방식으로 합성하였다.(표 1)

우리는 H5N1비루스의 복제 과정에 필수적인 *NP*, *PB2* 유전자의 ORF 및 보수적인 5'-UTR 와 3'-UTR에서 각각 2개씩의 배열을 표적으로 하였다.(그림 1)

표 1. 조류독감바이러스유전자 *PB2*와 *NP*(5', 3'-UTR포함)의 표적배열들에 특이적인 pre-miRNA발현올리고DNA염기배열

AmiRNA명	5'—3'염기배열
SM155-miRNA/PB2-a(SMP-a)-5	tgctgtttattatctggacagtatcagttttggccactgactgact gatactgtagataataaat
SM155-miRNA/PB2-a(SMP-a)-3	cctgattattatctacagtatcagtcagtcagtggccaaaactgat actgtccagataataaac
SM155-miRNA/PB2-b(SMP-b)-5	tgctgtattgaaatatattgacctgcttttggcctctgactgaagca ggcaaaatattcaatt
SM155-miRNA/PB2-b(SMP-b)-3	cctgaattgaatattttgctgcttcagtcagaggccaaaagcagg tcaaataatttcaatac
SM155-miRNA/PB2-c(SMP-c)-5	Tgctgttaaactattcgacactaattgttttggccactgactgaca attagtgtaatagtttat
SM155-miRNA/PB2-c(SMP-c)-3	cctgataaactattacactaatttgtcagtcagtgccaaaaacaatt agtgtcgaatagtttaac
SM155-miRNA/NP-a(SMN-a)-5	tgctgatatctacttctcaattcaagggttttggccactgactgacc ttgaattgaagtagataa
SM155-miRNA/NP-a(SMN-a)-3	cctgttatctacttcaattcaagggtcagtcagtgccaaaaccttg aattgagaagtagat ac

## 표제 속

AmiRNA명	5'-3'염기배열
SM155-miRNA/NP-b(SMN-b)-5	tgctgtcggtgagtgattatctaccgcgttttggccactgactgacg ggtagatacactcaccgt
SM155-miRNA/NP-b(SMN-b)-3	cctgacggtgagtgatctaccgcgtcagtcagtgccaaaacgggt agataatcactcaccgac
SM155-miRNA/NP-c(SMN-c)-5	tgctgagaaacaagggtatcttctgttttggccactgactgaca agaaaaatccttgtttca
SM155-miRNA/NP-c(SMN-c)-3	cctgtgaaacaaggattttcttctgtcagtcagtgccaaaacaaga aaaatacccttgtttctc
SM155-miRNA/53R(SM53R)-5	tgctgtgacagtggtgatagattccgggttttggccactgactgacc ggaatctaaacactgtct
SM155-miRNA/53R(SM53R)-3	cctgagacagtggttagattccgggtcagtcagtgccaaaaccgga atctatcaacactgtca
SM155-miRNA/Luc-a(SML-a)-5	tgctgatttgtattcagcccatatcggttttggccactgactgacc gatatggggaatacaaaa
SM155-miRNA/Luc-a(SML-a)-3	cctgttttgtattcccatatcggtcagtcagtgccaaaaccgat atgggctgaatacaaatc

SM53R는 음성대조로서 물고기비루스(Rana grylio virus: RGV) 53유전자를 표적으로 하는 SM155-miRNA이며 사람과 조류독감비루스계놈중에 상동배열이 존재하지 않는다. SML-a는 양성대조로서 루씨페라제를 표적으로 하는 SM155-miRNA이다.

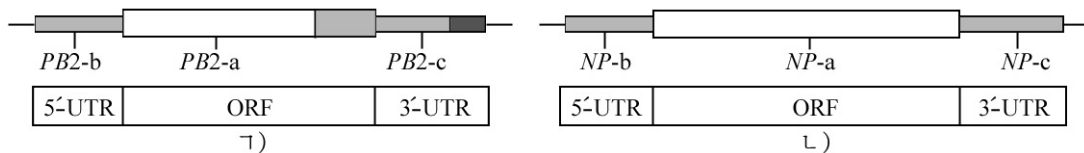


그림 1. 조류독감비루스 PB2 (γ)와 NP유전자(λ)에 대한 SM155-miRNA의 표적선정

PB2-a, PB2-b, PB2-c는 조류독감비루스 PB2유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR에 대한

SM155-miRNA의 표적, NP-a, NP-b, NP-c는 조류독감비루스 NP유전자의

ORF, 5'-UTR, 3'-UTR에 대한 SM155-miRNA의 표적

2) 293T세포에서 서로 다른 위치의 표적을 가진 단일 및 다중발현AmicroRNA들이 조류독감비루스유전자 PB2의 침묵에 주는 영향

우선 293T세포에 Luc-PB2(5'-UTR, 3'-UTR포함)융합단백질발현운반체와 함께 PB2유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR를 표적으로 하는 단일 및 다중발현SM155-miRNA들을 형질감염시키고 48h후에 상대루씨페라제활성을 평가한 결과는 그림 2와 같다.

SMLC6을 양성대조(P.C.)로 하고 SM53R를 음성대조(N.C.)로 하여 PB2유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA들이 루씨페라제활성에 미치는 영향을 본 결과 ORF를 표적으로 하는 SMP-a의 경우 5'-UTR나 3'-UTR를 표적으로 하는 SMP-b와 SMP-c의 경우보다 조금 낮은 값을 보여주었으나 큰 차이가 없었다. 이것은 루씨페라제유전자를 표적으로 하는 경우 3'-UTR를 표적으로 할 때 제일 낮았던 실험결과와 차이가 있으나[1] 11개의 조류독감비루스유전자들에 보편적인 5'-UTR와 3'-UTR배열을 표적으로 하여 비루스증식을 억제할수 있는 기초를 마련해준다.[6]

또한 단일SM155-miRNA(SMP-a, P-b, P-c)나 다중발현SM155-miRNA(SMP-ab, P-ac, P-abc)나 모두 음성대조에 비하여 상대루씨페라제활성이 20%이하로 낮아졌으나 서로 다른 표적을

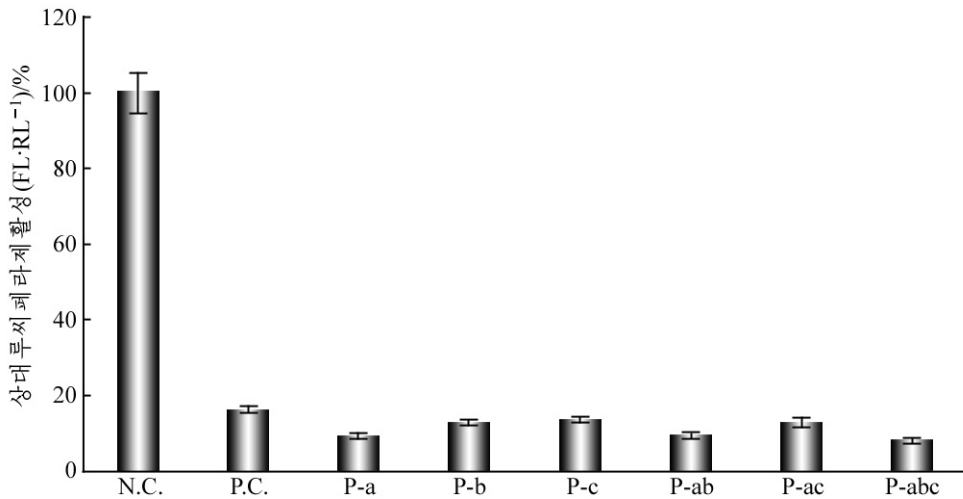


그림 2. *PB2* 유전자의 서로 다른 위치(5'-UTR, ORF 및 3'-UTR)를 표적으로 하는 단독 및 다중발현 SM155-miRNA들이 루시페라제 활성에 주는 영향

293T 세포에서 pCMV-5'-UTR-Luc-PB2(3'-UTR)와 함께 *PB2* 유전자의 5'-UTR, ORF 및 3'-UTR를 표적으로 하는 단일 및 다중발현 SM155-miRNA들을 각각 형질감염시켰다. N.C.는 비상관성 SM155-miRNA 음성대조, P.C.는 루시페라제의 ORF를 표적으로 하는 SM155-miRNA/Luc-a(SML-a) 양성대조, P-a, P-b, P-c는 *PB2* 유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA/PB2-a(SMP-a), SM155-miRNA/PB2-b(SMP-b), SM155-miRNA/PB2-c(SMP-c), P-ab는 P-a와 P-b를, P-ac는 P-a와 P-c를, P-abc는 P-a, P-b 및 P-c를 다중연결한 것

가진 단일발현 SM155-miRNA들이 다중연결되어 발현되어도 침묵효율에는 크게 영향을 주지 않는다는 것을 보여준다.

이 결과는 내원성 유전자의 ORF에 대한 다중발현 AmiRNA의 경우와 유사[9]하였는데 이것은 외래 유전자에 대한 인트론성 miRNA의 다중발현이 유전자 침묵효과를 높이는 것보다는 침묵의 기회를 높여주는 데 관련될 수 있다는 것을 암시해 준 선행 실험 결과[1]와도 잘 일치한다.

우리는 또한 293T 세포에 Luc-PB2(5'-UTR, 3'-UTR 포함) 융합 단백질 발현 운반체와 함께 *PB2* 유전자의 5'-UTR, ORF 및 3'-UTR를 표적으로 하는 단일 SM155-miRNA와 *PB2* 유전자와 *NP* 유전자를 동시에 표적으로 하는 다중발현 SM155-miRNA들을 각각 형질감염시키고 48h 후에 상대 루시페라제 활성을 평가하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는 바와 같이 *PB2* 유전자와 *NP* 유전자를 동시에 표적으로 하는 다중발현 SM155-miRNA(SMPa+Na, Pab+Na, Pa+Nac)들의 경우에 루시페라제 활성이 뚜렷하게 낮아졌다. 이것은 1개의 운반체에 AmiRNA를 다중발현 시킴으로써 동시에 *PB2*와 *NP* 유전자를 침묵시킬 수 있는 가능성을 보여준다.

다음 우리는 유전자 침묵효과를 RNA 수준에서 검토하기 위하여 293T 세포에 *PB2*(5'-UTR, 3'-UTR 포함) 유전자 발현 운반체와 함께 각이한 표적의 단일 및 다중발현 SM155-miRNA들을 형질감염시키고 48h 후에 실시간 정량 RT-PCR 법으로 상대 *PB2* mRNA 발현량을 평가하였는데 그 결과는 그림 4와 같다.

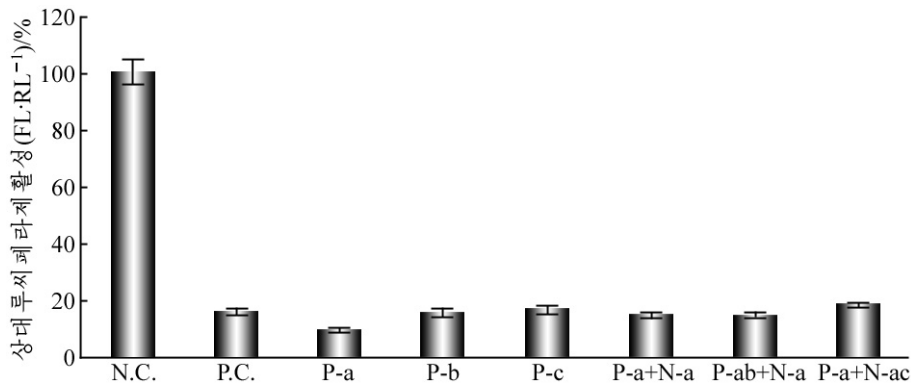


그림 3. 조류독감비루스의 *PB2*과 *NP*유전자를 표적으로 하는 단일 및

다중발현SM155-miRNA들이 루씨페라제 활성에 주는 영향

293T세포에서 pCMV-5'-UTR-Luc-PB2(3'-UTR)와 함께 *PB2*유전자의 5'-UTR, ORF 및 3'-UTR를 표적으로 하는 단일SM155-miRNA들 및 *PB2*유전자와 *NP*유전자를 동시에 표적으로 하는 다중발현SM155-miRNA들을 각각 형질감염시켰다. N.C.는 비상관성 SM155-miRNA음성대조, P.C.는 루씨페라제의 ORF를 표적으로 하는 SM155-miRNA/Luc-a (SML-a)양성대조, P-a, P-b, P-c는 *PB2*유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA/PB2-a(SMP-a), SM155-miRNA/PB2-b(SMP-b), SM155-miRNA/PB2-c(SMP-c), N-a, N-c는 *NP*유전자의 ORF, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA/NP-a(SMN-a), SM155-miRNA/NP-c(SMN-c), P-a+N-a는 P-a와 N-a를, P-ab+N-a는 P-a, P-b 및 N-a를, P-a+N-ac는 P-a, N-a 및 N-c를 다중연결한것

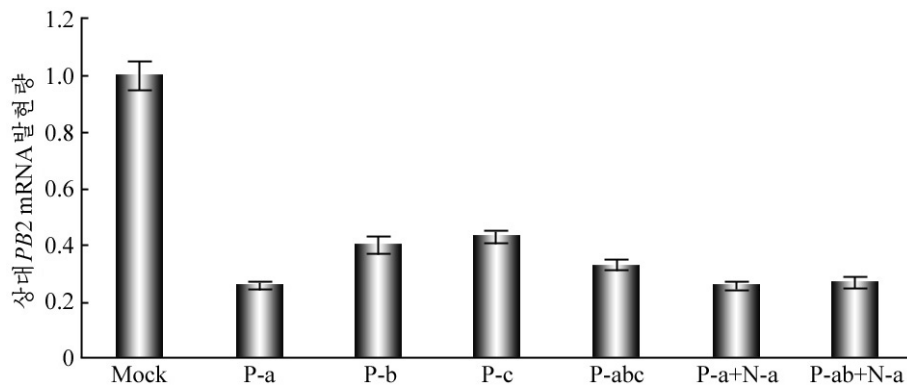


그림 4. 각이한 표적의 단일 및 다중발현SM155-miRNA들이 조류독감비루스

*PB2*유전자의 침묵에 주는 영향

293T세포에서 pCMV-5'-UTR-PB2(3'-UTR)와 함께 *PB2*유전자의 5'-UTR, ORF 및 3'-UTR를 표적으로 하는 단일SM155-miRNA들 및 *PB2*유전자와 *NP*유전자를 동시에 표적으로 하는 다중발현SM155-miRNA들을 각각 형질감염시켰다. Mock는 비상관성SM155-miRNA음성대조, P-a, P-b, P-c는 *PB2*유전자의 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA/PB2-a (SMP-a), SM155-miRNA/PB2-b(SMP-b), SM155-miRNA/PB2-c(SMP-c), N-a, N-c는 *NP*유전자의 ORF, 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA/NP-a(SMN-a), SM155-miRNA/NP-c(SMN-c),

P-a+N-a는 P-a와 N-a를, P-ab+N-a는 P-a, P-b 및 N-a를, P-abc는

P-a, P-b 및 P-c를 다중연결한것

그림 4에서 보는바와 같이 실시간정량RT-PCR실험결과와 앞에서 본 루씨페라제활성측정결과와 잘 일치하였다. 즉 단일SM155-miRNA나 다중발현SM155-miRNA나 모두 뚜렷하게 *PB2*유전자의 mRNA발현수준을 억제하였으며 *PB2*유전자의 5'-UTR나 3'-UTR를 표적으로 하는 SM155-miRNA도 높은 수준의 침묵효과를 보여주었다.

## 맺 는 말

인트론성 AmiRNA(SM155-miRNA)가 조류독감유전자 *PB2*의 ORF영역뿐만아니라 조류독감 바이러스유전자들에 보편적으로 보수성이 높은 5'-UTR와 3'-UTR에 표적배열을 가지는 경우에도 높은 효율로 mRNA발현이 억제된다.

조류독감바이러스 *PB2*유전자를 표적으로 하는 단일발현SM155-miRNA나 동시에 *PB2*와 *NP* 유전자를 표적으로 하는 다중발현SM155-miRNA는 모두 뚜렷하게 *PB2*유전자의 mRNA발현 수준을 억제한다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 56, 12, 113, 주체99(2010).
- [2] 신언삼 등; 생물학, 4, 24, 주체100(2011).
- [3] C. B. Nielsen et al.; RNA, 13, 11, 1894, 2007.
- [4] G. Du et al.; Febs. J., 273, 23, 5421, 2006.
- [5] H. Zhou et al.; Antiviral Res., 76, 2, 186, 2007.
- [6] J. Li et al.; Virus Genes, 37, 1, 88, 2009.
- [7] K. Zhou et al.; Biotechnol., 135, 2, 140, 2007.
- [8] R. L. Bodreau et al.; Mol. Ther., 17, 1, 169, 2009.
- [9] Y. P. Liu et al.; Nucleic Acids Res., 36, 9, 2811, 2008.
- [10] Z. Shan et al.; Mol. Biol. Rep., 36, 6, 1483, 2009.

주체103(2014)년 8월 5일 원고접수

## **Silencing Effect by Single, Multiple Artificial microRNA with Different Targeting Sites in AIV *PB2* Gene**

*Sin On Sam, Kim Yu Sin and Rim Thae Gun*

To design the artificial miRNA that remain effective despite antigenic drifts and shifts, we chose the *PB2* gene (including 5'-UTR and 3'-UTR) as the target sequence, which are essential to viral replication and host range restriction and contain highly conserved sequences in 5'-UTR and 3'-UTR, and studied gene silencing by 6 single-, multiple-SM155-miRNAs designed for *PB2* or *NP* genes.

The results showed that the *PB2*-specific single-, multiple-SM155-miRNAs targeting 5'-UTR, 3'-UTR and ORF of *PB2* could effectively down-regulate the expression of *PB2*, multiple-SM155-miRNAs simultaneously targeting *PB2* and *NP* gene also could down-regulate the expression of *PB2* gene, efficiently.

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