

## B 세포에서 Epstein-Barr virus microRNA들의 전사 및 성숙

김도년 · 오상택 · 이재면<sup>1</sup> · 이원근<sup>2</sup> · 이숙경\*

가톨릭대학교 의과대학 생명과학과 면역생물학연구소, <sup>1</sup>연세대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>명지대학교 생명과학정보학부

Received October 10, 2005 / Accepted November 29, 2005

**Biogenesis of Epstein-Barr Virus MicroRNAs in B Cells.** Do Nyun Kim, Sang Taek Oh, Jae Myun Lee<sup>1</sup>, Won-Keun Lee<sup>2</sup>, and Suk Kyeong Lee\*. *Research Institute of Immunobiology, Department of Biomedical Sciences, Catholic University of Korea, Seoul, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Yonsei University, Seoul, Korea, <sup>2</sup>Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Yongin, Kyunggi-do, Korea* - We investigated microRNA (miRNA) biogenesis of Epstein-Barr virus (EBV) which is the first virus shown to produce viral miRNAs. As expected, expression of all the reported EBV miRNAs were detected by Northern blot in an EBV-infected B cell line, B95-8; BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3, BART1, and BART2. The putative EBV pri-miRNAs and pre-miRNAs predicted from the known mature EBV miRNA sequences were detected by RT-PCR in B95-8 cells. Many animal miRNA genes exist as clusters of 2-7 genes and they are expressed polycistronically. As the EBV miRNAs are clustered in two regions of the EBV genome, we examined whether these clustered EBV miRNA genes are also expressed polycistronically. A long polycistronic transcript with the expected size (1602 bp) corresponding to the BHRF1-1~BHRF1-2~BHRF1-3 was amplified. However, any polycistronic transcript containing both BART1 and BART2 was detectable in B95-8. These results suggest that EBV miRNAs may be processed in a similar way with animal miRNAs and that some of the clustered EBV miRNAs can be transcribed polycistronically.

**Key words** - EBV, miRNA, biogenesis, polycistronic

MicroRNA (miRNA)는 21-25 뉴클레오타이드 길이의 작은 단일 가닥 RNA로서 표적 mRNA의 3' UTR (untranslated region) 염기서열에 결합하여 전사 후 단계에서 유전자발현을 조절하는 조절인자이다[2,3,7]. 꼬마선충(*C. elegans*)의 *lin-4*와 *let-7* 유전자 산물이 작은 non-coding RNA이며[3], 표적유전자 mRNA의 3' UTR에 결합하여 단백질 발현을 억제한다는 사실이 밝혀지면서 miRNA 유전자의 존재가 처음 알려지기 시작하였다[2]. 선충 이외에도 사람, 쥐, 초파리, 애기장대 등 모든 고등 동식물에서 miRNA가 발견되었다. 동물의 miRNA들은 계놈의 다양한 위치에서 발견되는데 대부분은 유전자와 유전자 사이에 존재하지만 일부는 인트론 내에도 존재한다[27]. 많은 동물 miRNA들이 계놈의 특정 위치에 2 개 이상씩 클러스터를 이루어 밀집하게 존재하는 현상을 나타내고 이들은 polycistronic 하게 전사되므로 서로 유사한 발현양상을 나타낸다[14, 31]. 동물의 miRNA는 핵과 세포질에서 두 단계의 processing 과정을 거친다[19]. 즉, miRNA의 초기 전사체 형태인 primary miRNA (pri-miRNA)는 핵 내에서 Drosha와 DGCR8 복합체에 의해 헤어핀 구조를 갖는 60~80 뉴클레오타이드 길이의 pre-miRNA로 잘려진다[9,10, 12,18]. 이 pre-miRNA는 exportin-5/RanGTPase에 의해 세포질로 운반되고, 세포질에서 Dicer에 의해 약 21 뉴클레오

타이드 길이의 성숙한 miRNA가 만들어지게 된다[4,5,11,15-17,20,32,33]. Dicer에 의해 잘려진 성숙한 miRNA는 miRNA-induced silencing complex (miRISC)로 알려진 단백질들과 복합체를 형성하고, 표적유전자와 상보적인 정도의 차이에 따라 완벽하게 일치하게 되면 mRNA를 자르게 되고, 불완전하게 일치하게 되면 단백질 합성을 억제하게 된다.

Epstein-Barr Virus (EBV)는 암유발성을 갖고 있는 허피스 바이러스로, 버킷형 림프종, 비인강 상피암종, 호지킨 림프종, 위암 및 NK/T 세포 림프종 등 악성 종양 및 림프증식증(예, post transplant lymphoproliferative disease) 등의 발생과 밀접히 연관되어 있으며[21,22], in vitro 에서 B 세포를 형질전환시켜 지속적으로 배양 가능한 림프구양세포주(lymphoblastoid cell line)를 형성한다[1,22]. Pfeiffer 등에 의해 바이러스로는 처음으로 EBV가 바이러스 miRNA를 발현한다는 것이 보고되었다[25]. EBV 음성 버킷형 림프종 세포에 B95-8 EBV를 감염시켜 latency III 감염 상태로 만든 세포주로부터 분리한 small RNA을 클로닝하여 분석한 결과 약 4%의 RNA가 EBV로부터 만들어진 것이 발견되었다[25]. 또한 EBV에 감염된 B 세포들에서 BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3와 BART1, BART2 등의 EBV miRNA 발현이 Northern blot으로 확인되었다. 이 결과에 뒤 이어 Pfeiffer 등은 EBV가 속하고 있는 다른 허피스바이러스들에 대해 컴퓨터를 이용한 염기서열 분석을 통하여 miRNA일 가능성이 있는 염기서열들을 예측한 후 바이러스 miRNA들의 존재 여부를 탐색한

**\*Corresponding author**

Tel : +82-2-590-2396, Fax : +82-2-532-0575

E-mail : suklee@catholic.ac.kr

결과 33 종의 바이러스 miRNA를 새로이 발견하였다[24]. 이들 바이러스 miRNA들의 염기서열을 비교한 결과, 동물세포 miRNA들의 염기서열과 계능 상의 배열이 중간에 잘 보존되어 있는 것과는 달리, 같은 허피스바이러스에 속하는 바이러스들의 miRNA 염기서열은 바이러스 마다 서로 다르고 miRNA가 각 바이러스 계능 상에 나타나는 부위도 전혀 보존되어 있지 않다는 흥미로운 사실을 알게 되었다. 게다가 대부분의 동물세포 miRNA가 RNA polymerase II에 의해 전사된다고 알려진 것과는 상이하게 마우스 허피스바이러스인 MHV-68의 miRNA들 중 일부는 RNA polymerase III에 의해 전사된다는 것도 확인되었다. 이상의 결과들은 바이러스의 miRNA들이 기존에 알려진 동물세포의 miRNA들과는 다른 특징을 가진다는 것을 암시한다.

보고된 5 종의 EBV miRNA 서열들은 EBV 계능의 두 부분에 밀집되어 존재한다. 첫 번째 위치는 BHRF1 유전자 근처로 BHRF1-1 서열은 5' UTR에 있고 BHRF1-2와 BHRF1-3 서열은 3' UTR 부위에 존재한다. 다른 EBV miRNA들인 BART1과 BART2는 BARTs (BamHI-A region rightward transcripts) 유전자의 인트론 부분에 위치한다[25]. 클러스터로 존재하는 이들 EBV miRNA들이 동물 세포의 miRNA들과 유사하게 polycistronic한 하나의 전사체로 전사되는지 아니면 개별적으로 전사된 다음 성숙한 miRNA로 형성되는지는 아직 알려져 있지 않다. 또한, 이들 바이러스 miRNA들도 동물세포 miRNA들과 같이 pri-miRNA 및 pre-miRNA 단계를 거쳐 성숙된 miRNA로 만들어지는지 연구된 바가 없다.

본 논문에서는 EBV 양성 B 세포주인 B95-8에서 EBV miRNA들의 발현을 재확인하고, 이들이 동물세포와 유사한 miRNA 생성 과정을 거쳐 만들어지는지를 확인하기 위해 전구체인 pri-와 pre-miRNA에 대한 RT-PCR을 실시하였다. 그리고 클러스터를 이루는 동물세포 miRNA gene들과 같이 EBV miRNA들도 polycistronic하게 전사되는지 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 배양

EBV 양성 세포주인 B95-8 세포주는 10% Fetal Bovine Serum (Gibco, Grand Island, NY), penicillin-streptomycin (10,000 U/ml, Gibco)과 Fungizone (10,000 U/ml, Gibco)이 포함된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 배양하였다.

### DNA와 RNA의 추출

B95-8 세포주에 Phenol-CHCl<sub>3</sub>을 처리하여 DNA를 추출하였다. RNA는 B95-8 세포주에 RNAzol™ B reagent (Tel-Test Inc., Friendswood, TX)를 첨가하여 제품의 사용법에 따라 추출하였다. RNA 침전물은 0.3% DEPC 용액에 녹여 -70°C에 보관하였다. 작은 분자의 RNA (~200 nt 이하)는 mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion, Austin, TX)를 사

용하여 정제하였다. 추출된 RNA는 혼입될 가능성이 있는 DNA를 제거하기 위해 모두 RNase-free DNase I로 처리한 다음 실험에 사용하였다[28].

### 역중합효소 연쇄반응(RT-PCR)과 중합효소 연쇄반응(PCR)

추출된 RNA 1 µg에 200 units의 Reverse Transcriptase M-MLV (Takara, Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이때 pri-miRNA 증폭을 위한 cDNA 합성에는 hexamer로 된 random primer와 oligo dT를 절반씩 섞어 사용하였고, pre-miRNA 증폭을 위해서는 random primer를 사용하여 reverse transcription 반응을 실시하였다. 경우에 따라 BHRF1-1과 BART2에 대해 예측되는 pri- 및 pre-miRNA 확인을 위해서는 각 EBV miRNA에 특이적인 reverse primer들 (Fig. 1)을 사용하기도 하였다(자세한 내용은 결과 참조). 음성 대조군은 cDNA 합성 시 reverse transcriptase를 빼고 반응시켰다. 각각의 EBV miRNA 서열을 근거로 예측되는 pri-miRNA와 pre-miRNA의 발현 확인을 위해 Schmittgen[29] 등이 사용한 방법을 응용하여 Fig. 1에 표시된 primer들을 제작하고 사용하였다. 추정되는 EBV pre-miRNA들의 forward와 reverse primer들은 pre-miRNA의 2 차 구조 염기서열 내측과 상보적이 되도록 하였다. 한편, 추정되는 EBV pri-miRNA들의 증폭을 위해서는 sense primer들이 pre-miRNA들의 5' 말단으로부터 27 bp upstream(상류)에 위치하도록 제작하였다(Fig. 1).

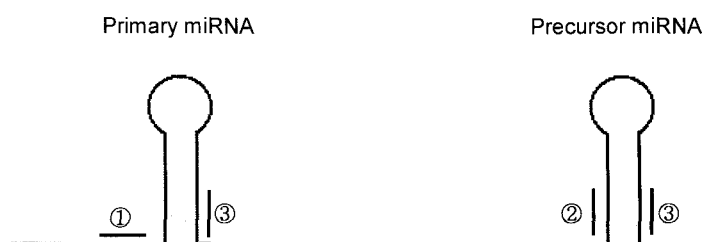
### Northern blot

추출한 RNA 30 µg을 15% polyacrylamide-urea gel에 전기영동한 후 Zeta-Probe Blotting Membrane (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)으로 이동시켰다. 각각의 EBV miRNA와 상보적인 oligo-nucleotide 5' 말단을 P<sup>32</sup>-ATP와 T4 kinase를 이용하여 표식하였다. Pre-hybridization과 hybridization은 ExpressHyb Hybridization Solution (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)을 이용하여 수행하였다. Hybridization 후, membrane은 실온에서 2 X SSC (0.05% SDS)로 15 분간 2 번 세척해 준 후 0.1 X SSC (0.1% SDS)로 역시 상온에서 15 분간 2 번 세척해 주었다. 동량의 RNA가 겔에 loading 되었는지 확인하기 위해 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 5s rRNA 밴드를 비교하였다.

## 결 과

### EBV 감염 B 세포에서 EBV miRNA 발현 확인

EBV가 감염된 B 세포에서의 EBV miRNA 발현 양상을 살펴보기 위해 Northern blot을 실시하였다. 기대되는 바와 같이 B95-8에서 보고된 5 종의 EBV miRNA 들인 BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3, BART1, BART2가 모두 확인되었다(Fig.



miRNA	① Sense primer 5'→3'	② Forward primer 5'→3'	③ Reverse primer 5'→3'
BHRF1-1	TTTCTATGTGGGGTGGAA	AACCTGATCAGCCCCGGAGT	TGTC AACCTCTTCAGGCCCG
BHRF1-2	CCATGGGGGCTTACAAGAAT	AAATTCTGTTGCAGCAGATAGC	TTCAATTTCTGCCGCAAAAGATA
BHRF1-3	CCATATCTACAATTGGGTGT	ACGGGAAGTGTGTAAGCAC	TAACGAAGAGCGTGAAGCAC
BART1	TTGCCTCGGCATCTCCTCAC	GTCCTAGTGGAAGTGACGTG	AGACATAGTGGATAGCGGTG
BART2	GCAGTCAGTTATTTGCATG	TTTTCTGCATTGCCCCCTGC	TATTTTCTCCAATCGCTCC

Fig. 1. Primers used for the amplification of the putative EBV pri- and pre-miRNAs. For the pre-miRNAs, both forward and reverse primers were designed to be located within the hairpin sequence. For the pri-miRNA, sense primers were designed to be located to the 27 bp upstream from 5' end of the pre-miRNAs.

2). 상대적으로 BART1이 짧은 노출시간(16 시간)에서도 발현이 확인된 반면, BART2의 경우 오랜 시간 동안(7 일 이상) 노출 시에만 확인되었다. EBV 음성 세포주인 BJAB의 경우 EBV miRNA 발현은 전혀 검출되지 않았다. 하지만 인간세포의 miRNA인 miR16의 경우 B95-8과 BJAB에서 모두 발현되는 것을 확인하였다. 겔 상의 5s rRNA를 EtBr로 염색하고 정량하여 동량의 RNA를 loading 하였음을 확인하였다.

### EBV miRNA에 대한 pri-miRNA 및 pre-miRNA 발현 확인

동물세포의 miRNA들은 전구체인 pri-miRNA와 pre-miRNA가 단계적인 절단 과정을 거치며 형성된다. EBV miRNA들도 이와 같은 생성 과정을 거치는지 확인하고자 Fig. 1에 제시된 primer들을 사용하여 예측되는 EBV pri-miRNA와 pre-miRNA들에 대한 RT-PCR을 실시하였다. 예측되는 EBV miRNA들이 EBV 게놈의 UTR 또는 인트론 부위에 존재하기 때문에, B95-8에서 추출한 total RNA에 random primer와 oligo dT를 1:1로 섞어 reverse transcription하여 얻어진 cDNA를 사용한 결과 보고된 5 종의 EBV miRNA에 대한 예측되는 pri-miRNA들이 모두 증폭되었다(Fig. 3A). B95-8에서 추출한 RNA를 DNase I으로 처리한 다음 역 전사효소를 첨가하지 않고 반응시켜 PCR한 산물을 음성대조구로 사용하였다. Pre-miRNA의 증폭을 위해서는 60~80 뉴클레오타이드 크기의 EBV pre-miRNA 만을 선택적으로 증폭하기 위해서 작은 RNA (< 200 nt)를 분리할 수 있는 mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion)를 이용하여 RNA를 추출하여 실험하였다. cDNA 합성을 위해 random primer를 사용한 결과 BART1, BHRF1-2 및 BHRF1-3에 대해 예측되는 EBV pre-miRNA들은 잘 검출되었으나(Fig. 3B), BHRF1-1과 BART2에 대해 예측되는 pre-miRNA들은 검출이 미미하였다 (data now shown). 이는 random primer를 사용하는 경우 존재하는 많은 RNA들에 대해 모두 cDNA가 합성되므로 비교적 적은 빈도로 존재할 가능성이 있는 EBV pre-miRNA들의 경우 RT-PCR로 검출이 어려울 수 있기 때문으로 해석할 수 있다. 예상과 같이 random primer를 사용하여 비교적 검출이 어려웠던 pre-BHRF1-1과 pre-BART2의 경우 각 miRNA 특이

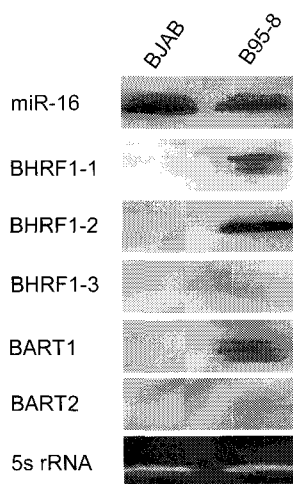


Fig. 2. Expression profile of EBV miRNAs in B95-8. Northern blot for EBV miRNAs was performed using total RNA isolated from B95-8. BJAB was included as a negative control. The expression of human miR-16 was assessed for reference. Equal loading of RNA on the gel was monitored by ethidium bromide staining of the 5s rRNA band before transfer to the membrane.

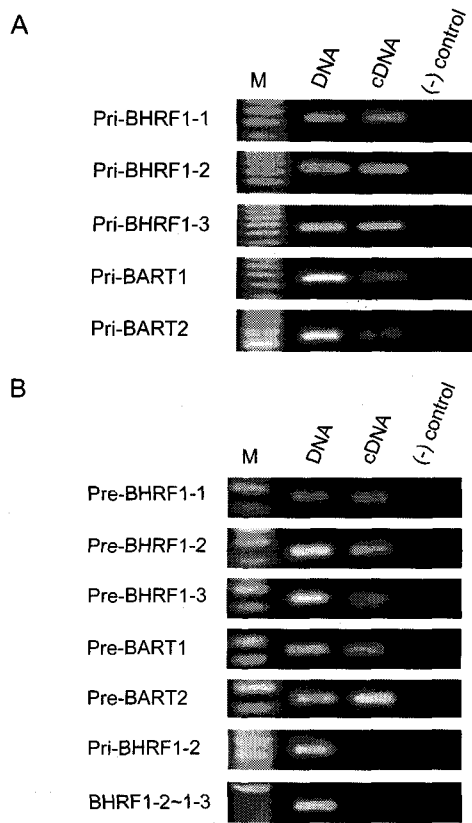


Fig. 3. Amplification of the putative EBV pri- and pre- miRNAs by RT-PCR. RNA isolated from B95-8 was used for the reverse transcription reaction. The produced cDNAs were amplified by PCR using appropriate primer pairs shown in Fig. 1 for pri-miRNA or pre-miRNA. As a negative control, reverse transcriptase was omitted during the reaction. DNA was included for PCR reaction as a positive control to show the expected size of each amplification product. (A) To detect putative EBV pr-miRNAs, cDNA was synthesized from total RNA of B95-8 using an equal mixture of random hexamer and oligo dT. (B) To detect putative EBV pre-miRNAs, cDNA was synthesized from small RNA (< 200 nt). Random hexamer was used for pre-BART1, pre-BHRF1-2, and pre-BHRF1-3 in the reverse transcription reaction, while sequence specific primers were used for pre-BHRF1-1 and pre-BART2.

reverse primer를 사용해 합성한 cDNA를 PCR에 사용한 결과 쉽게 증폭산물을 얻을 수 있었다(Fig. 3B). 실험에 사용된 RNA가 200 뉴클레오타이드 이하의 작은 크기의 RNA 만을 포함한다는 것을 확인하기 위해, pri-miRNA 중의 하나인 pri-BHRF1-2 특이 primer와 서로 인접하여 위치하는 BHRF1-2와 BHRF1-3을 포함하는 223 bp의 전사체를 증폭할 수 있는 primer도(Fig. 1) 함께 사용하여 실험하였다. 200 bp 이하인 작은 크기의 RNA 만 선별하여 사용한 경우 pri-BHRF1-2 나 BHRF1-2~1-3 전사체들은 negative control에서와 마찬가지로

증폭되지 않았다(Fig. 3B).

### EBV miRNA들의 polycistronic 한 발현 가능성 조사

클러스터로 존재하는 많은 동물세포의 miRNA들이 polycistronic하게 전사된다고 알려져 있으므로 두 곳에 클러스터를 이루며 위치하는 EBV miRNA들도 polycistronic하게 전사가 일어나는지를 RT-PCR로 조사하였다. 먼저 BHRF1 유전자의 3' UTR 부분에 위치하는 두 개의 EBV miRNA들인 BHRF1-2와 BHRF1-3 부분을 포함하는 전사체를 증폭할 수 있는 BHRF1-2의 sense primer와 BHRF1-3의 reverse primer를(Fig. 1) 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 B95-8에서 223 bp의 기대되는 PCR 생성물이 확인되었다(Fig. 4A). 더 나아가 BHRF1 유전자의 5' UTR 부위에 위치하는 BHRF1-1 EBV miRNA와 3' UTR에 위치하는 BHRF1-2 및 BHRF1-3을 모두 포함하는 전사체를 증폭할 수 있는 BHRF1-1의 sense primer와 BHRF1-3의 reverse primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 DNA와 동일한 크기의 전사체가 확인되었다(Fig. 4A). BART1과 BART2 EBV miRNA도 polycistronic하게 발현되는지 확인하기 위해 BHRF1의 miRNA들과 유사한 방법으로 RT-PCR을 실시하였다. B95-8에서 분리된 DNA를 사용한 경우 BART1과 BART2를 포함하는 1.6 kb의 PCR 생성물이 검출되었으나 RNA를 사용한 RT-PCR에서는 전혀 증폭된 산물이 없었다(Fig. 4B).

### 고 찰

EBV 양성 B 세포주인 B95-8과 EBV 음성 세포주인 BJAB을 이용하여 Northern blot을 실시한 결과 기대했던 것처럼 B95-8에서는 최근 보고된 5 가지의 EBV miRNA들이 확인되었고 BJAB에서는 전혀 검출되지 않았다. 일부 EBV miRNA가 2 또는 3 개의 서로 다른 크기에서 검출되는 것은 Dicer에 의한 double stranded RNA 절단의 특성 때문일 것이며 이러한 예는 동물세포 miRNA에서도 그 예를 쉽게 찾아 볼 수 있다[17,26]. 일반적으로 pri-miRNA는 수백 뉴클레오타이드 이상의 긴 염기서열을 가지므로 EBV의 pri-miRNA를 검출하기 위해서는 B95-8에서 추출한 total RNA를 사용하였다. 동일한 total RNA를 60~80 뉴클레오타이드 길이의 pre-miRNA를 검출하기 위해서 사용하면 증폭된 산물이 pri-miRNA에서 유래한 것인지 혹은 일부 mRNA에서 유래한 것인지 구분하기에 어려움이 있다. 따라서 pre-miRNA를 검출하기 위해서는 200 뉴클레오타이드 이하의 작은 RNA 만을 따로 분리하여 사용하였고 이 작은 RNA로 부터는 pri-miRNA가 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 200 뉴클레오타이드 이하의 작은 RNA로부터 pre-miRNA 특이적인 primer에 의해 증폭된 RT-PCR 산물은 mRNA나 pri-miRNA 전사체들에서 기인한 것이 아니라 pre-miRNA

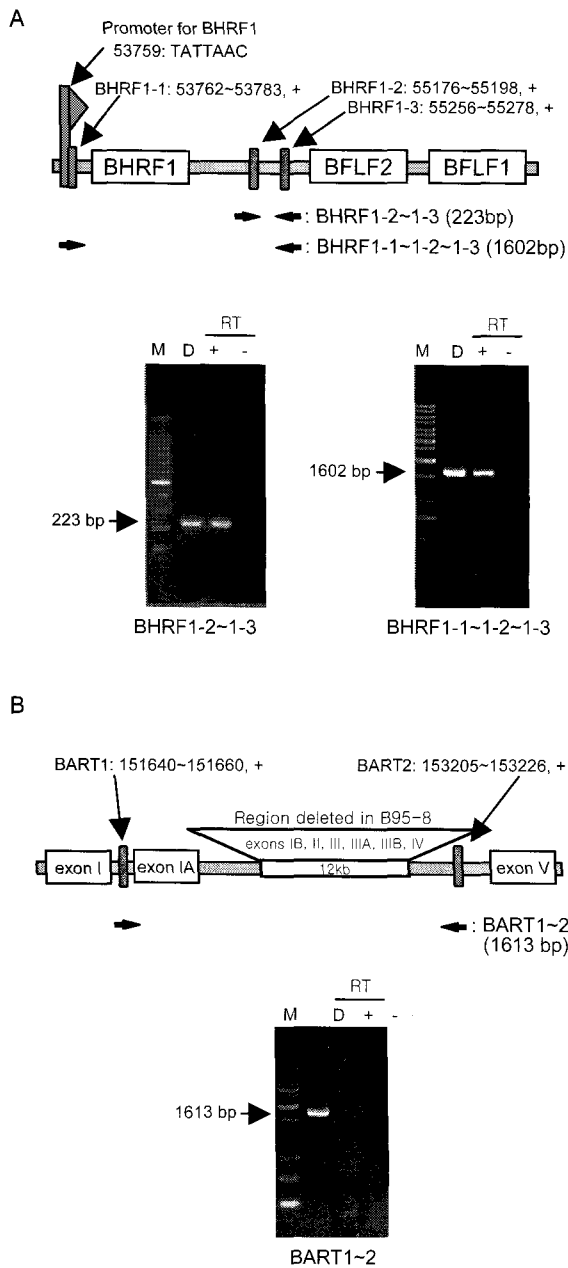


Fig. 4. Amplification of the polycistronic transcripts encoding EBV miRNAs. (A) Genomic positions of EBV miRNAs. BHRF1-1 is located at the 5' UTR (untranslated region) while BHRF1-2 and BHRF1-3 are located at the 3' UTR of the BHRF1 mRNA. The indicated sequences were amplified by RT-PCR using primers for BHRF1-2~1-3 or BHRF1-1~1-2~1-3. (B) BART1 and BART2 are located in the intronic regions of the BARTs (Bam HI-A region rightward transcripts) gene. A putative transcript containing both BART1 and BART2 was amplified by RT-PCR using an appropriate primer set. As a negative control, reverse transcriptase was omitted during the reverse transcription reaction. D indicates PCR products from DNA, which served as a positive control.

가 증폭된 것이라고 판단된다.

EBV BHRF1-1, 1-2, 1-3는 BHRF1 유전자의 UTR 부분에 위치하므로 BHRF1 mRNA가 전사되는 B95-8에서는 BHRF1-1, 1-2, 1-3의 pri-miRNA와 BHRF1 mRNA를 RT-PCR로 구분해 낼 수 없다. BHRF1은 Bcl2 homolog로 EBV에 잠재감염된 B 세포에서 EBV의 Cp나 Wp 프로모터로부터 발현되고[13] lytic cycle이 유도되면 BHRF1-1 보다 down stream에 존재하는 H 프로모터가 활성화되어 발현되는 것으로 알려져 있다[23]. BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3 miRNA들의 경우 이 3 가지 miRNA를 모두 포함하는 긴 전사체를 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 예상된 긴 전사체가 확인되어 이들이 B95-8에서 polycistronic하게 전사됨을 알 수 있다. 그러나 본 연구의 결과만으로는 BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3가 latency 상태에서 활성을 나타내는 BHRF1 프로모터와 동일한 프로모터에 의해 발현이 조절되는 지는 분명하지 않다. 또한 BHRF1-1의 예측되는 pre- 및 pri-miRNA가 BHRF1-2나 BHRF1-3보다 다소 적게 증폭되는 경향을 보이는 RT-PCR 결과도 위에서 설명된 프로모터와의 위치를 고려할 때 앞으로 면밀한 후속 연구가 필요하다는 것을 제시한다.

BARTs 는 CST (complementary strand transcript) 또는 BARF0 RNAs로 불린다. B95-8 서열 150,641 위치에 전사 시작점 (transcription start site)이 존재하며 splicing을 통해 적어도 16 개의 서로 다른 전사체로 형성된다[6,8,30,31]. B95-8에서는 wild type EBV와 비교할 때 Fig. 4에 표시된 바처럼 BARTs의 exon IB, II, III, IIIA, IIIB, IV에 해당하는 12 kb 정도가 삭제되어 있다. BART1의 경우 exon I과 exon IA 사이의 intron 부위에 존재하며, BART2의 경우 exon V 앞의 intron 부위에 존재하므로 B95-8에서 삭제된 부위는 BART1 과 BART2 서열에는 영향을 미치지 않는다[31]. 12 kb가 삭제된 B95-8에서는 BART1 과 BART2 사이가 1,643 bp 정도로 짧으며, B95-8의 DNA를 사용한 PCR 결과 기대되는 크기의 증폭 산물이 얻어졌다. 그러나 BART1과 BART2 miRNA들에 대한 각각의 pri-miRNA와 pre-miRNA가 모두 확인되는 것과는 달리 BART1과 BART2를 둘 다 포함하는 전사체는 RT-PCR로 증폭이 안 되었다. 이것은 BART1과 BART2가 polycistronic한 전사체로 만들어지지만 빠른 splicing 과정에 의해서 두 miRNA를 모두 포함하는 전사체가 검출될 만큼 충분량 존재하지 않기 때문일 수 있다. 또는 이 두 miRNA들은 BHRF1-1~1-2~1-3 miRNA들과는 다르게 polycistronic이 아닌 monocistronic하게 전사되기 때문일 수도 있다. 만일 이 두 miRNA들이 polycistronic하게 조절된다면 그 발현양이 서로 크게 다르지 않을 것으로 기대되기 때문에 반복된 여러 차례의 실험을 통하여 EBV miRNA들 중 BART1은 다량 검출되는 반면 BART2는 매우 소량만이 검출될 뿐만 아니라 예측되는 BART2 pri-와 pre-miRNA도 적게 검출되는 현상은 이 두 miRNA들이 monocistronic하게 전사될 가능성을 지지하는

듯이 보인다. BART2는 다른 EBV miRNA들과는 달리 EBV의 latency보다 lytic cycle에서 더 많이 발현되거나, 특수한 자극을 받아야만 발현이 유도될 가능성도 있을 것이다.

현재까지 EBV miRNA에 대한 타겟 유전자가 무엇인지는 규명된 바가 없다. 단지 EBV miRNA와의 염기서열 상보성에 기초하여 Bcl2, p53, CXCL12, CXCL11 등 몇 가지 유전자들이 타겟 후보로 추정되었다[25]. 추정된 후보 타겟 유전자들은 매우 다양한 기능을 하며 앞으로 그들이 정말 EBV miRNA에 의해 발현 조절을 받을 것인가에 관한 연구가 활발히 진행될 것으로 예상된다. EBV miRNA들이 polycistronic하게 조절된다면 이들 miRNA에 의해 발현이 조절되는 target 유전자들도 서로 상관성을 가지고 조절될 것이다. EBV miRNA들이 polycistronic하게 조절됨으로써 많은 세포 및 바이러스 유전자들을 동시 다발적으로 조절하는 것이 EBV의 latency 유지나 세포의 형질전환, 세포 증식 조절 등에 보다 유리할 것이다.

요 약

우리는 바이러스로는 최초로 miRNA를 생성한다고 보고된 Epstein-Barr virus (EBV)를 대상으로 EBV miRNA biogenesis를 연구했다. 먼저 EBV에 감염된 B 세포인 B95-8로부터 보고된 5 종의 EBV miRNA들인 BHRF1-1, BHRF1-2, BHRF1-3, BART1, 및 BART2 모두가 발현됨을 확인하였다. 그 다음 성숙된 EBV miRNA 서열로부터 예측되는 pri-와 pre-miRNA들이 B95-8에서 각각 검출되어 EBV miRNA들도 이미 알려진 동물세포 miRNA와 유사한 생성 및 성숙과정을 거칠 가능성을 확인하였다. 게놈 상에 2~7 개씩 밀집하여 존재하는 동물세포 miRNA들과 유사하게 EBV 게놈의 2 부위에 밀집해서 존재하는 EBV miRNA들도 polycistronic하게 발현되는지 조사한 결과 B95-8에서 BHRF1-1, BHRF1-2 및 BHRF1-3를 포함하는 1,602 뉴클레오타이드의 긴 전사체가 RT-PCR로 확인되었다. 반면 BART1과 BART2는 monocistronic하게 전사될 가능성이 확인되었다. 본 연구를 통하여 EBV miRNA들도 동물세포 miRNA들과 유사하게 polycistronic 하게 발현될 수 있으며 pri-와 pre-miRNA 과정을 거쳐 성숙된 miRNA로 생성될 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2004-000-10847-0)지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Aman, P., B. Ehlin-Henriksson and G. Klein. 1984.

Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations. *J. Exp. Med.* **159**, 208-220.

2. Ambros, V., B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun and T. Tuschl. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277-279.

3. Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.

4. Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.

5. Bohnsack, M. T., K. Czaplinski and D. Gorlich. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185-191.

6. Chen, H., J. Huang, F. Y. Wu, G. Liao, L. Hutt-Fletcher and S. D. Hayward. 2005. Regulation of expression of the Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts. *J. Virol.* **79**, 1724-1733.

7. Cullen, B. R. 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* **16**, 861-865.

8. de Jesus, O., P. R. Smith, L. C. Spender, C. Elgueta Karstegl, H. H. Niller, D. Huang and P. J. Farrell. 2003. Updated Epstein-Barr virus (EBV) DNA sequence and analysis of a promoter for the BART (CST, BARF0) RNAs of EBV. *J. Gen. Virol.* **84**, 1443-1450.

9. Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235.

10. Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotai, N. Cooch and R. Shiekhattar. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-240.

11. Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun and C. C. Mello. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34.

12. Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin and V. N. Kim. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016-3027.

13. Hayes, D. P., A. A. Brink, M. B. Vervoort, J. M. Middeldorp, C. J. Meijer and A. J. van den Brule. 1999. Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Molecular Pathology* **52**, 97-103.

14. He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernandez-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **9**, 828-833.

15. Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore. 2001. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838.

16. Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon and R. H. Plasterk. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654-2659.
17. Knight, S. W. and B. L. Bass. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2269-2271.
18. Landthaler, M., A. Yalcin and T. Tuschl. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* **14**, 2162-2167.
19. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419.
20. Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98.
21. Miller, G., J. F. Enders, H. Lisco and H. I. Kohn. 1969. Establishment of lines from normal human blood leukocytes by co-cultivation with a leukocyte line derived from a leukemic child. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**, 247-252.
22. Miller, G. and M. Lipman. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 190-194.
23. Oudejans, J. J., A. J. van den Brule, N. M. Jiwa, P. C. de Bruin, G. J. Ossenkoppele, P. van der Valk, J. M. Walboomers and C. J. Meijer. 1995. BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the BCL-2 protooncogene, is transcribed in EBV-associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood* **86**, 1893-1902.
24. Pfeffer, S., A. Sewer, M. Aagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. A. Grasser, L. F. van Dyk, C. K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, G. Randall, B. D. Lindenbach, C. M. Rice, V. Simon, D. D. Ho, M. Zavolan and T. Tuschl. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* **2**, 269-276.
25. Pfeffer, S., M. Zavolan, F. A. Grasser, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander and T. Tuschl. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**, 734-736.
26. Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson and O. Radmark. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* **21**, 5864-5874.
27. Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley. 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* **14**, 1902-1910.
28. Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer and M. W. Reed. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time method. *Anal. Biochem.* **285**, 194-204.
29. Schmittgen, T. D., J. Jiang, Q. Liu and L. Yang. 2004. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res.* **32**, e43.
30. Smith, P. R., O. de Jesus, D. Turner, M. Hollyoake, C. E. Karstegl, B. E. Griffin, L. Karran, Y. Wang, S. D. Hayward and P. J. Farrell. 2000. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **74**, 3082-3092.
31. van Beek, J., A. A. Brink, M. B. Vervoort, M. J. van Zijp, C. J. Meijer, A. J. van den Brule and J. M. Middeldorp. 2003. In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J. Gen. Virol.* **84**, 2647-2659.
32. Yan, K. S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng and M. M. Zhou. 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**, 468-474.
33. Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011-3016.