

일본뇌염 바이러스 Nakayama-NIH주와 국내에서 분리된 일본 뇌염 바이러스주의 유전적 차이 및 항원성 차이의 조사

국립보건원 바이러스질환부 신경계 바이러스과, ¹한양대학교 의과대학 약리학교실
조해월 · 남재환 · 이유헌 · 김은정 · 이호동 · 윤경식 · 고현철¹

=Abstract=

Antigenic and Genetic Differences between the Prototype Nakayama-NIH Strain and Korean Strains of Japanese Encephalitis Virus

Hae-Wol Cho, Jae-hwan Nam, Yoo-Jin Lee, Eung-Jung Kim, Ho-dong Lee,
and Hyun-Chul Koh¹

Division of Arboviruses, Department of Virology, National Institute of Health, Korea,
¹*Department of pharmacology, College of medicine, Hanyang University.*

The characterization of the 5 Korean isolates (K96P10, K94P05, K91P55, K87P39, and K82P01) of Japanese encephalitis virus (JEV) was compared with JE virus prototype Nakayama-NIH (NKY-NIH) using prM/M and envelope gene sequences of the JEV genome and phylogenetic analysis. The antigenic analysis of these viruses were done by the cross-hamagglutination inhibition (HI) test using polyclonal antibodies against Korean isolates and NKY-NIH. The sequence homology of the Korean isolates and NKY-NIH ranged between 87.4 % - 95.6 % at the nucleotide level and between 98.2 % - 97.2 % at the amino acid level over the E nucleotides compared. Alignment of E protein amino acid sequences revealed that residue positions E89, E129, E221, E244, E327, E366, E459, and E477 characterized the Korean strains. According to phylogenetic analysis bases on the E nucleotide, there are at least 2 genetic types of JEV existing in Korea and Korean strains were distinct from NKY-NIH. However, the cross HI test results of all the Korean isolates were serologically no different from NKY-NIH strain.

Key Words : Japanese Encephalitis virus, prM and envelope gene. Cross-hamagglutination inhibition, Phylogenetic analysis.

서 론

일본뇌염은 우리 나라를 포함한 동남아시아에서 매년 35,000명 이상의 환자가 발생하여 이중 25%는 사망, 50%는 심각한 후유증을 동반하는 질병으로 이 지역의 공중보건학상 중요한 위치를 차지하고 있다 [1]. 일본뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus; JEV)는 1935년 일본에서 처음 분리보고 되었으며 [2] 우리 나라에서는 1946년 Sa-

bin 등에 의해 인천에 주둔했던 미군 중 일본뇌염으로 사망한 환자의 뇌조직으로부터 일본뇌염 바이러스가 분리 보고된 바 있다 [3].

일본뇌염 백신 생산에 사용되고 있는 strain은 크게 다음의 3종류가 사용되고 있다. 마우스 뇌내에서 유래한 불활화 백신으로 Nakayama-NIH 주와 Beijing-1주가 사용되고 있으며, Primary hamster kidney (PHK) cell에서 유래한 불활화 백신으로 P3주를 사용하고 있다. 또한 PHK cell에서 유래된 약독화 백신주는 SA14-14-2주를 사용하고 있

다. 일본뇌염백신균주로는 동남아시아 대부분의 국가에서 NKY-NIH주를 사용하고 있으며 현재 중국과 일본에서는 Beijing주를 사용하고 있다. 그러나 Nakayama주와 Beijing주 두주 모두 여러 지역의 JEV 분리주에 대해서 마우스에서 cross-protection 효과를 보이고 있으나 Beijing 주가 NKY-NIH 주보다 더 넓게 모든 JEV 분리주에 반응을 보이고 있다 [4]. 국내에서는 1970년대부터 Nakayama-NIH주를 사용하여 일본뇌염 백신을 제조하여 일본뇌염 바이러스 유행 시기 전에 백신 접종을 권장한 이후로는 환자 발생이 급격히 감소하여 1985년 이후로는 5-6명의 환자만이 발생하였으며 1995년에는 한 명의 환자도 발생하고 있지 않다. 그러나 이 질환의 유행 양상이 다변적이고 아직도 매년 자연계 매개모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)로부터 일본뇌염 바이러스가 분리되고 있으며 또한 일본뇌염 항체 보유율이 점차 감소되어 감수성 인구가 많아지면 1982년과 같이 불시에 대유행을 초래할 수 있는 요소를 상당히 포함하고 있다 [5]. 또한 일본뇌염 바이러스는 Flaviviridae의 +RNA 바이러스이며 RNA 바이러스는 자연적으로 복제시 0.03 % - 2 % of genome/year의 비율로 돌연변이를 일으켜 돌연변이주가 나타날 수 있다 [6]. 또 본 연구진이 지속적으로 매년 국내에서 분리되는 일본 뇌염 바이러스주의 혈청학적 특징을 조사한 결과 국내 분리주의 Hemagglutination test의 최적 pH가 Nakayama-NIH주와 차이가 있었으며 Capsid와 prM의 부분적인 유전자 염기 서열을 분석하여 국내 분리주가 Nakayama주와 유전 진화적인 차이가 있음을 확인하였다 [7]. 그러나 일본뇌염 바이러스의 53 kd의 envelope protein이 hemagglutination, viral neutralization, virion assembly, 및 membrane fusion등 바이러스 특징을 나타내는 중요한 부분이기 때문에 [8,9] 본 연구진은 국내 분리 일본뇌염바이러스주의 envelope gene의 유전자 서열을 분석하였다.

본 논문에서는 여러 연도의 국내 일본뇌염 분리주의 prM/M에서 envelope까지, 또는 envelope의 염기서열을 분석하고 cross-Hemagglutination Inhibition test를 실시하여 국내에서 분리되는 일본뇌염 바이러스주와 현재 국내에서 일본뇌염 불활화 백신 제조주로 사용되고 있는 Nakayama주와의 관련성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. JE Virus 준비

분석할 일본뇌염 바이러스는 1982, 1987, 1991, 1994, 및 1996년에 국내에서 분리된 주를 사용하였다. 이 바이러스는 여러 지역에서 채집된 일본뇌염 바이러스 매개모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)에서 분리하였으며 생후 2-3일된 영아 마우스의 뇌내에 0.02ml 씩 접종하고 3-4 일 후 일본뇌염 바이러스 감염증상이 나타난 뇌를 무균적으로 채취하여 인산완충식염수 (PBS, PH 7.4, 0.01M)를 10% (W/V) 되게 하였다. 뇌조직은 homogenizer로 갈아 4℃에서 12,000rpm으로 30분간 원심분리하여 뇌조직을 제거한후 상층액을 영아마우스 뇌내에서 증식 시켜 사용하였다 (<5 passages) 본 논문에서 분석되고 비교되어진 바이러스주는 Table 1에서 정리하였다.

2. 국내 분리주에 대한 polyclonal antibody의 준비

국내분리주 K82P01, K87P39, K91P55, K94P05에 대한 polyclonal antibody를 제작 하기 위하여 G.P를 사용하였다. 각 분리주를 초회면역시에는 complete adjuvant와 1:1로 섞어 0.5 ml씩 각각 5마리의 G.P에 복강내로 면역하고 10일 후 2차 면역시 incomplete adjuvant를 역시 동일 분량 섞은 후 면역한다. 10일 후 바이러스 만을 G.P에 면역하고 10일후 혈액을 채혈하여 혈청분리후 -20℃ 저장하여 분석시 사용하였다.

2. 혈구응집시험 및 혈구응집억제시험

모든 과정은 Clarke and Casals [10]의 방법을 따랐다. Cross-hemagglutination test를 위해 사용한 바이러스는 모두 16 HA unit으로 조절한 후 사용하였다.

3. RNA 분리

바이러스의 RNA를 분리하기 위해 다음의 세 가지 방법을 사용하였다. 첫번째 방법은 SDS-Proteinase K-phenol 방법이고 두번째 방법은 RNA TackTM resin kit (Biotec)를 사용한 방법이며, 세번째 방법은 Guanidine Thiocyanate kit (Promega)를 사용한 방법이며 각각 제조회사의 추천된 방법을 사용하여 분리하였고, 분리된 RNA는 -70℃에서 보관하여 사용하였다.

4. cDNA 제조 및 RT-PCR

Table 1 Isolation history of Japanese encephalitis virus strains compared in this study

Strain	Year	Location	Source	Sequence Source
K96P10	1996	Korea, Wando	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	This paper
K94P05	1994	Korea, Wando	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	This paper (U34929)
K91P55	1991	Korea, Wando	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	This paper(U34928)
K87P39	1987	Korea, Wando	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	This paper(U34927)
K82P01	1982	Korea,	<i>C. tritaeniorhynchus</i>	This paper(U34926)
Nakayama	1935	Japan, Tokyo	Human brain	McADA et al., (1987)(24)
JaOArS982	1982	Japan, Osaka	Mosquito pool	Sumiyoshi et al., (1987)(25)
SA-14	1954	China, Xian	<i>Culex pipiens</i>	Nitayaphan et al.,(1990)(26)
Kamiyama-1	1966	Fukuoka	Human brain	Hasegawa et al., (1992)(27)
Beijing-1	1949	China, Beijing	Human brain	Hasegawa et al., (1992)
691004	1969	Sri Lanka	Human brain	Hasegawa et al., (1992)
Muar	1952	Sigapore	Human brain	Hasegawa et al., (1992)
DH 20	1985	Nepal, Dharan	Human brain	U03690
KPPO34-	1982	Thailand,	Mosquito pool	U03693
P3	1949	China, Beijing	Mosquito pool	U03695
8256	1982	China, Taiwan	Mosquito pool	U03691
826309	1982	India, Goa	Human brain	U03689
Saigon	1962	Vietnam, Saigon	NK	U03696
Indonesia	NK	Indonesia	Mosquito pool	U03692
p20778	NF	NF	NF	Z34096
733913	NF	NF	NF	Z34095

* GenBank accession number, NK: Not known, NF: Not found

seven sense primers,

5'ATGTGGCTCGCAAGCTTGGC3' (Primer JEM1, nucleotide 115 to 134),
 5'GTCCAATATGGACGGTGCACGCGGAC3' (Primer JEV 271, nucleotide 378 to 403),
 5'ATGCTTCAGTCACTGACATCTCGAC3' (primer JEV 731, nucleotide 851 to 870),
 5'TACTTCACCATCCTCCTGCT3' (Primer JEV1, nucleotides 625 to 644),
 5'GGAAGCATTGACACATGTGC3' (Primer JEV 9, nucleotides 997 to 1016),
 5'GTTGTTGCTCTTGGGTCACA3' (Primer JEV 3, nucleotides 1430 to 1449),
 5'ACTCAAAGGTGCTAGTCGAG3' (Primer JEV 4, nucleotides 1765 to 1784); five antisense primers,
 5'AGTGGTGGTTCCATGCACAA3' (Primer JEV 5R, nucleotides 1110 to 1129),
 5'GTCCACTCCTTGGCTCACAGTC3' (primer JEV 1108R, nucleotide 1218 to 1242),
 5'GGTGGCCTGATGTTAACTTC3' (Primer JEV 6R, nucleotides 1519 to 1538),
 5'CTTTGCCAGCGTCTTCCA3' (Primer JEV 7R, nucleotides 1892 to 1911),
 5'ATACCTATCCACCCAGGCTT3' (Primer JEV 8R, nucleotides 2162 to 2181).

분리한 RNA를 포함한 용액을 8ul, RT buffer (5X) 4ul, dNTP (2.5mM) 4ul, Random Hexamer (50 A260 Units, Boehringer Spelling) 2ul, DTT (0.1M) 2ul을 섞고 70℃에서 5분간 반응시키고

얼음에 급속히 넣었다. 이 반응물에 Reverse Transcriptase (SuperScript™ II, 200 units) 1ul을 첨가한 후 42℃ 온도에서 30분 반응 후 95℃에서 5분간 불활화 시켜 -20℃에 저장하여 사용하였

Table 2. Envelope protein 1486 nucleotide and 496 amino acid sequence homologies (% identities). All values were calculated by using PAUP 3.1.1 program and based on the shorter of the two sequences in the pairwise comparison

	K96P10 K94P05 K91P55 K87P39 K82P01 Nakayama Beijing-1 JaOAS982 691004 Kamiyama-1 SA-14 733913 8256 826309 DH20 Indonesia KPP034p20778 Saigon P3 Muar																										
K96P10	*	97.6	97.2	95.4	97.2	97.6	97.2	97.8	96.4	97.6	97.6	97.4	97.8	97.0	97.4	97.6	97.4	97.0	97.4	97.6	97.4	97.6	96.0	96.4	89.5		
K94P05		-	98.0	95.8	97.2	97.2	96.8	97.4	96.0	97.2	97.2	96.8	97.4	96.6	97.0	97.2	96.8	97.4	96.6	97.0	97.2	97.0	97.2	95.6	96.0	89.1	
K91P55			-	96.8	98.0	97.8	97.4	97.6	96.6	97.4	97.2	97.4	96.8	97.2	97.4	97.0	97.4	96.8	97.2	97.4	97.0	97.4	95.6	96.6	89.5		
K87P39				-	96.8	97.4	97.4	97.2	96.4	97.0	96.8	97.0	96.8	96.6	96.4	96.8	96.4	96.8	96.6	96.4	96.8	96.4	97.0	94.9	96.0	88.3	
K82P01					-	98.2	97.8	98.4	97.0	98.2	98.0	97.8	98.0	97.6	97.8	98.0	97.8	98.2	97.8	98.0	97.8	98.2	96.2	97.0	89.1		
Nakayama						-	99.2	99.4	98.8	99.2	99.0	99.2	99.0	98.6	99.2	99.2	98.6	99.2	99.2	99.2	98.6	99.2	97.6	98.2	90.3		
Beijing-1								99.0	98.0	98.8	98.6	98.8	98.6	98.2	98.4	98.6	98.2	98.8	98.2	98.8	98.2	98.8	96.8	97.8	89.7		
JaOAS982									-	98.2	99.8	99.2	99.0	99.2	98.8	99.0	99.2	98.8	99.0	99.2	98.8	99.4	97.4	98.0	90.7		
691004										-	98.0	97.8	98.2	97.8	97.4	98.0	98.0	97.4	98.0	97.4	98.0	96.6	97.0	89.9			
Kamiyama-1											-	99.0	98.8	99.0	98.6	98.8	99.0	98.6	99.2	99.2	97.2	97.8	90.5				
SA-14												-	98.6	99.2	98.4	99.0	98.8	99.2	99.0	97.4	97.6	89.9					
733913													-	98.6	98.2	98.4	98.6	98.2	98.8	98.2	98.8	96.8	97.8	90.1			
8256														-	98.4	99.4	99.6	98.8	99.0	97.8	98.0	90.1					
826309															-	98.2	98.4	98.4	99.6	98.8	98.0	96.6	97.2	89.5			
DH20																-	99.6	98.6	98.8	97.6	97.8	90.1					
Indonesia																	-	98.4	99.0	97.6	98.0	90.3					
KPP034																		-	98.6	97.0	97.2	89.9					
p20778																			-	96.2	-	97.2	88.7				
Saigon																				-	94.6	96.2	-	95.8	88.7		
P3																					-	95.8	96.8	95.6	-	88.9	
Muar																							-	81.7	81.0	79.9	80.2

* Values above dashes (identity trace) are % identical amino acids and those below dashes are % identical nucleic acids.

Table 3. The results of Cross-Hamagglutination Inhibition test with 5 polyclonal antibodies from G.P. and 9 JEV isolates. The HA unit of virus is 16

Antibody	Virus								
	Nakayama	Jagor	Beijing	K82P01	K87P39	K91P55	K94P05	K95P20	K96P10
K82P01	160	160	640	320	320	160	160	160	160
K87P39	160	160	320	320	160	160	320	160	160
K91P05	160	320	320	320	320	320	320	320	320
K94P05	160	160	320	160	160	320	320	160	160
Nakayama	160	160	320	160	160	160	160	160	160

다.

제조된 cDNA 2ul, mixed dNTP (2.5mM) 16ul, sense and antisense primer (20um) (Table 1) 5ul, 10 X PCR buffer 10ul, Taq polymerase 2.5 units (Boehringer Mannheim)에 pfu enzyme을 0.25 unit을 첨가하고 전체 양이 100ul이 되도록 증류수로 적정하였다. 이 PCR mixture를 Perkin-Elmer-Cetus thermal cyler (Model 9600)로 (94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 3분, 30 cycles) 증폭한 후 마지막 cycle에서 충분한 polymerization time을 주기 위해 72℃에서 10분간 1 cycle을 반응하였다. 증폭이 끝난 PCR products는 etidium bromide를 포함한 1% agarose gel에서 running하여 확인하였다. K94P05와 K96P10은 prM/M에서 envelope gene까지를 증폭하고 나머지는 envelope gene만을 증폭하였다. 사용된 primer는 Nakayama strain genomic sequence [24]를 참조하여 다음과 같이 제작하였다.

5. 증폭산물의 cloning

증폭된 PCR 산물을 TA cloning kit (Invitrogen)를 사용하여 cloning 하였으며 염기서열 분석을 위하여 2개 이상의 독립된 colony를 배양하여 염기서열을 분석하고 비교하였다.

6. Automatic sequencing

Cloning된 일본뇌염바이러스의 유전자를 분석하기 위하여 ABI PRISM 377 DNA sequencer를 사용하였다. Dye-terminator labeling 방식으로 반응하기 위하여 cloning 된 plasmid 1 ug, Oligo 3.2 pmol 1ul, reaction mixture (Perkin Elmer) 9.5 ul을 증류수로 20 ul로 적정하여 90℃에서 20초간 1 cycle, 96℃, 10초, 55℃ 30초, 60℃ 4분간 25 cycle을 반응하였다. 반응중 Centri-Sep 컬럼을 미리 reconstitute 시킨 후 이를 이용하여 반응된 산물을 정제하고 염기서열을 분석하였다.

7. The Analysis of Sequence homology and phylogenetic analysis

Sequencing 된 data는 DNASIS와 PROSIS를 사용하여 비교 분석되었으며 Phylogenetic analysis를 위하여 PAUP 3.1.1을 사용하였다.

결 과

1. JEV gene의 cloning

K94P05와 K96P10은 primer JEM 1과 JEV 8R을 사용하여 prM/M에서 envelope까지 PCR을 실시하였으며 2066 bp의 산물을 확인한후 cloning하였고 나머지 연도는 primer JEV 1과 JEV 8R을 사용하여 1556 bp의 envelope gene만을 확인하여 cloning 하였다. PCR 산물은 TA cloning kit를 활용하여 cloning되었으며 E.coRI 효소를 사용하여 확인 하고 독립된 colony를 두 개 이상 확보하여 염기서열을 분석하였다.

2. Cross-hamagglutination inhibition (Cross-HI) test

국내 분리주에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 Nakayama-NIH JaGar, Beijing 주 및 국내분리주들 사이의 cross-HI test를 실시하였다. HI test의 특성상 2 fold 정도의 오차를 감안할 때 table 3의 결과에 따르면 국내 분리주와 Nakayama주의 Hamagglutination antibody는 큰 차이 없이 Nakayama주와 국내 분리주 및 Beijing, JaGar 바이러스를 inhibition 하고 있다.

3. Nucleotide sequence accession numbers

국내에서 분리된 4주의 바이러스주의 envelope gene 염기서열은 NCBI Genbank data library에 등록하였다. Accession number는 K82P01, K87P39, K91P55, 및 K94P05에 대해서 각각 U34926, U34927, U34928, 및 U34929이며; K96P10은 아직 미등재 상태이다.

(A)

```

1                                                                 80
Nakayama : AUGAAGUUGUCAAAUJUCCAGGGGAAGCUUUUGAUGACCGUCAACAACACGGACAUUGCAGACGUUAUCGUGAUUCCCAA
K96P10   : .....C·A·····C·U·A·A·····C······A··········G·····C······C·····C
K94P05   : .....C·A·····C·U·A·A·····C······A··········G·····C······C·····C

81                                                                 160
Nakayama : CUAAAAAGGAGAGAACAGAUUGUUGGGUCCGGCAAUCGACGUCGGCUACAUGUGUGAGGACACUAUCACGUACGAAUGUC
K96P10   : .....U·A······················U·U········A·····C··········
K94P05   : .....U·A······················U·U········A·····C··········

161                                                                 240
Nakayama : CUAAGCUCACCAUGGGCAAUGAUCCAGAGGACGUGGACUGUUGGUGUGACAACCAAGAAGUCUGCGUCCAAUUGGACGG
K96P10   : ·G·····UG·G······C·····G·A········C·····C·····U········A····G·G·····U·CC
K94P05   : ·G·····UG·G······C·····G·A········C·····C·····U········A····G·G·····U·C

241                                                                 320
Nakayama : UGCACGCGGACCAGGCAUCCAAGCGAAGCAGGAGAUCCGUGUCGGUCCAAACACAUGGGGAGAGUUCACUAGUGAAUAA
K96P10   : .....A············A······A······U·····C······G······A·C········CC·
K94P05   : .....A············A······A······U······G····················

321                                                                 400
Nakayama : AAAAGAGGCUUGGCUGGAUJCAACGAAAGCCACACGAUACCUCAUGAAAACUGAGAACUGGAUCGUAAAGGAAUCCUGGGU
K96P10   : .....G·····G····················G········A······C·····U·
K94P05   : .....G······················G········A······C·····U·

401                                                                 480
Nakayama : AUGCUUUCUGGGCGCGAUACUUGGCUGGAUGCUUGGCAGUAACAACGGUCAACGCGUGGUUAUUCACCAUCCUCCUGCUG
K96P10   : .....GC·····A········C·····GU·C·····U·····G·····U·U····U····
K94P05   : .....GC·····A········C·····GU·C·····U·····G·····U·U····U····

481                                                                 501
Nakayama : UUGGUGGCUCGCGCUUACAGU
K96P10   : .....
K94P05   : .....
```

Fig. 1. Alignment of prM/M (A) and the envelope gene (B) nucleotide sequences of 5 Japanese encephalitis viruses isolated in Korea. Nucleotide position is numbered according to the order of prM/M and envelope protein sequence. Dots indicate identities.

(B)

	1	80
Nakayama	: UUCAACUGUCUUGGAAUUGGGCAAUCUGACUUCAUAGAAGGAGCCAGUGGAGCCACUUGGGUGGACUUGGUGCUAGAAGG	
K96P10	:G.....G..U.....UC.....U.....	
K94P05	: ..U.....G.....G..U.....UUC.....U.....	
K91P55	: ..U..U.....C.....	
K87P39	: ..U..U.....C.....	
K82P01	: ..U..U.....	
	81	160
Nakayama	: AGACAGCUGCUUGACAAUUAUGGCAAACGACAAACCAUUGGACGUCCGCAUGAUAACAUCGAAAGCUGUCCAACUUG	
K96P10	: ..U.....U.....C..C.....C..A..U.....U.....AG.....	
K94P05	: ..U.....U.....C.....C..A..U.....U.....AG.....	
K91P55	: ..U.....C.....U.....AG.....	
K87P39	: ..U.....C.....U.....AG.....	
K82P01	: ..U.....C.....U.....AG.....	
	161	240
Nakayama	: CUGAGGUCAGAAGUUACUGCUAUCAGUCUACUGACAUUUCGACGGUGGUCGGUCCCCACGACUGGAGAAGCU	
K96P10	:A....G.....C.....CC.....A.....A..C.....C.....	
K94P05	:A....G.....U.....C.....A.....A.....C.....	
K91P55	:C..U.....C.....C.....	
K87P39	:C..U.....C.....C.....	
K82P01	:C..U.....C.....C.....	
	241	320
Nakayama	: CACAACGAGAAGCGAGCUGAUAGUAGCUAUGUGCAAACAAGGCUACACUGAUCUGGGUGGGGCAACGGAUGGACU	
K96P10	:A..A..U.....CU..C.....C.....U.....C..C..A.....A..U.....	
K94P05	:A..A..U.....CU..C.....C.....U.....C..C..A.....A..U.....	
K91P55	:U.....U.....	
K87P39	:U.....U.....	
K82P01	:U.....U.....	
	321	400
Nakayama	: UUUCGGGAAGGGAAGCAUUGACACAUGUGCAAAAUUCUCCUGCACCAGUAAGGCGAUUGGGAGAACAUCGAGCCAGAAA	
K96P10	:A.....C.....G..U..U..U.....C.....A.....UG.....A.....G..	
K94P05	:A.....C.....U..U.....C.....	
K91P55	:U.....	
K87P39	:U.....	
K82P01	:C.....	
	401	480
Nakayama	: ACAUCAAAUACGAAGUGGCAUUUUUGUCAUGGAACCAACCAUUCGGAACCAUGGGAUUUAUCAGCGCAAGUUGGG	
K96P10	:G.....G.....A..C.....C.....C.....C.....A..A.....	
K94P05	:C.....C.....A..	
K91P55	:G.....G.....A..C.....C.....C.....C.....A..A.....	
K87P39	:G.....C.....A..	
K82P01	:C.....A..	

Fig. 1B.

```

481
Nakayama : GCGUCCCAGGCGGCAAAGUUUACAGUAACACCCAAUGCUCCUUCGUAUACCCUUAACUUGGUGACUACGGAGAAGUCAC
K96P10 : .....U·A·A.....U.....U·A.....C·A.....C·G.....U·U.....G.....
K94P05 : .....C.....
K91P55 : .....U·A·A.....U.....U·A.....C·A.....C·G.....U·U.....
K87P39 : .....C.....
K82P01 : .....C.....
561
Nakayama : ACUGGACUGAGGCCAAGGAGUGGACUAAACACUGAAGCGUUUACGUC AUGACCGUGGGUCAAAAGUCAUUUUUGGUCC
K96P10 : .....U.....A.....G.....C·C·U.....U·G.....C·A.....
K94P05 : .....G.....C.....
K91P55 : .....U.....A.....G.....C·U.....C·G.....C·A.....
K87P39 : .....G.....G.....C.....
K82P01 : .....G.....C.....

641
Nakayama : ACAGGGAAUGGUUUC AUGAUCUCGUCUCCUUGGACGCCCCUUCGAGCACAGCGUGGAGAAACAGAGAACUCCUCAUG
K96P10 : ·U.....CG···C·UU···U·C···U···C·A···G·A····
K94P05 : ·U.....C.....C.....U.....
K91P55 : ·U.....C···C·U.....A···A···
K87P39 : ·U.....C.....
K82P01 : ·U.....C.....C···U.....

721
Nakayama : GAUUUGAAGAGGCGCACGCCACAAAACAGUCCGUUGUUGCCUUGGGUCACAGGAAGGAGGCCUCCAUCAGGCGUUGG
K96P10 : .....C···A·U.....A···C·A····G.....A····
K94P05 : .....A.....C.....
K91P55 : .....A.....A···C·A····G·G···A····
K87P39 : .....C.....
K82P01 : .....A.....A···C···

801
Nakayama : AGGAGCCAU CGUGGAGUACUCAAGCUCAGUGAAGUUAACAUCAGGCCACCUAAA AUGCAGGCGUAAA AUGGACAAAC
K96P10 : .....G.....G.....U.....G.....A.....A···C·U···
K94P05 : .....G.....G.....U.....G.....A.....
K91P55 : .....G.....G.....U.....G.....A.....
K87P39 : .....G.....U.....
K82P01 : .....G.....G.....U.....G.....A.....

881
Nakayama : UGGCUCUCAAGGCACAAACCUAUGGCAUGUGCACAGAAAAAUUCUGUUCGCGAAAAUCCGGCGACAGGUCACCGGA
K96P10 : .....G·G···G·U.....U.....A.....A·C·U···
K94P05 : .....G·G···G·U.....U.....A.....A·C·U···
K91P55 : .....G·G···G·U.....U.....A.....A·C·U···
K87P39 : .....G.....U.....C.....
K82P01 : .....G·G···G·U.....U.....A.....A·C·U···

```

Fig. 1B.

961 1040

Nakayama : ACAGUUGUCAUUGAACUUUCCUACUCUGGGAGUGAUGGGCCUUGCAAAAUUCCGAUUGUCUCCGUUGCGAGCCUCAUUGA
K96P10 :G·CA·A.....A.....U·C·U.....A·C.....UU·A·C·
K94P05 :G·CA·A.....A.....U·C·U.....A·C.....UU·A·C·
K91P55 :G·CA·A.....A.....U·C·U.....A·C.....UU·A·C·
K87P39 :C.....U.....C.....
K82P01 :G·CA·A.....A.....U·C·U.....A·C.....UU·A·C·

1041 1120

Nakayama : CAUGACCCCCGUCGGGCGGUGACAGUGAACCCUUCGUCGSAUCUCCAGCGCCAAUCUAAAGGUGCUAGUCGAGA
K96P10 :U·G··A.....A.....A.....A·U··U.....G·U··
K94P05 :U·G··A.....A.....A.....U··U.....G·U··
K91P55 :U·G··A.....A.....A.....A·U··U.....G·U··
K87P39 :U.....C.....U.....
K82P01 :U·G··A.....A.....A.....A·U··U.....G·U··

1121 1200

Nakayama : UGGAACCCCCUUCGGAGACUCCUACAUCGUAUGGAAGGGGAGACAAGCAGAUUAACCACCAUUGGCACAAAGCGUGGA
K96P10 :U.....U·U··G··A·G.....U·C.....A.....
K94P05 :U.....C.....U·C.....A.....
K91P55 :U.....U·C.....A.....
K87P39 :G.....C.....U·U·A.....
K82P01 :U.....U·U··G··A·G.....C.....U·A.....

1201 1280

Nakayama : AGCACGCGUGGGCAAAGCCUUUCAACGACTUUUGAAGGGAGCUCAAAGACUGGCAGCGUUGGGGACACAGCCUGGACUU
K96P10 :U.....C.....A.....A·G··G··A··C·A·U.....U.....
K94P05 :U.....C.....A.....A·G··G··A··C·A·U.....U.....
K91P55 :U.....C.....A.....A·G··G··A··C·A·U.....U.....
K87P39 :G.....C.....A.....
K82P01 :U.....C.....A.....A.....U.....

1281 1360

Nakayama : UGGCUCUAUUGGAGGGUUUUAACUCCAUAGGGAAAGCCSUUCACCAAGUGUUUGGUGGUCUUCAGAACACUCUUGC
K96P10 : C···C···A.....U.....A··C··A··G··U·
K94P05 : C···C···A.....U.....A··C··A··G··
K91P55 : C···C···A.....U.....A··C··A··G··
K87P39 :C.....A.....U·
K82P01 : C···C···C·U··A.....A.....U·

1361 1440

Nakayama : GGGGAAUGUCUUGGAUCACACAAGGGCUAAUGGGGCCCCUACUCUGGAUGGGCGUUAACGCACGAGACCGAUCAAUU
K96P10 :A.....U··U··U··U··C··G··C
K94P05 :G.....A.....U··U··U··U··CUU··G··C
K91P55 :G.....A.....U··U··U··U··C··G··G··C
K87P39 :U.....U.....A·C.....U·
K82P01 :G.....U.....U··U··U··U··C··G··C

1441 1500

Nakayama : GCUUUGGCCUUCUUAAGCCACAGGAGGUGUCUGUGUUCUUAACGACCAUUGUCAUGCU
K96P10 : ··CC···U·UC···G···U.....C
K94P05 : ··CC···U·UC·G···G···U.....C
K91P55 : ··CC···U·UC·G···G···U.....C
K87P39 :G.....A.....
K82P01 : ··CC···U·UC·G···G···U.....C

Fig. 1B.

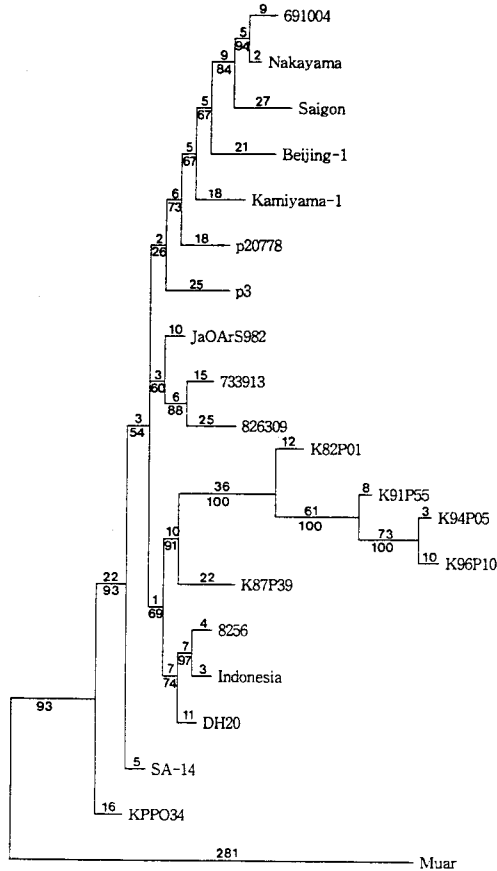


Fig. 3. Phylogenetic relationship of the complete envelope(E) gene sequences of 21 Japanese encephalitis virus strains isolated in Asia. Maximum parsimony trees were from the nucleotide sequence derived by using PAUP software. One thousand bootstrap replications were performed and confidence limits are listed as % below each branch. Horizontal lengths of branches, and the numbers above each branch, are proportional to nucleotide sequence differences.

4. JEV envelope protein의 nucleotide 염기서열 분석

Table 1에 있는 일본뇌염 분리주들 사이의 envelope protein의 nucleotide 및 단 백질 아미노산 서열을 국내에서 불활화 백신 제조에 사용하고 있고 일본뇌염 바이러스의 prototype인 Nakayama주의 것과 비교하였다 (Fig. 1, Fig. 2).

비교되어진 일본뇌염 분리주들의 분리 연도, 지역 및 유래는 Table 1에 나타내었다. 또 각 분리주들 사이의 nucleotide 및 염기서열의 상동성

을 %로 계산하여 Table 2에 나타내었다. 각 분리주들은 매개 모기에서 유래된 주와 인간 뇌에서 분리된 주로 나눌수 있는데 각 그룹간의 염기서열 특이점은 보이지 않고 있다.

각 분리주의 nucleotide 상동성보다 아미노산의 상동성이 높은 것은 유전자의 변이 위치가 wobble position에 주로 생겼기 때문에 아미노산의 변이는 크지 않은 것으로 나타났다. 국내 분리주는 Nakayama주와 nucleotide에서 87.4 % - 95.6 %까지 상동성이 있으며 아미노산 서열은 98.2 % - 97.2 %까지 상동성을 보이고 있다.

Table 1과 Table 2에 따르면 일본 뇌염 바이러스 분리주들은 분리 지역간의 거리상의 멀고 가까움으로 인한 염기서열상의 특징은 보이고 있지 않다.

5. JEV envelope protein의 아미노산 염기서열 분석

Ni & Barrett (1935)에 따르면 envelope gene에서 4 부분의 아미노산이 주로 변하는 것이 발견되었다 (E51, E209, E244, E366). 본 연구에서는 2부분의 주요변이 부분이 추가로 발견되었다 (E227, E327). 아미노산 염기서열 중 E89, E129, E221, E244, E327, E366, E459, E477은 국내에서 분리된 일본뇌염 바이러스에서 특징적으로 변이하고 있다 (Fig. 1B). 이부분의 아미노산 변이가 국내분리주의 혈청학적 특징을 나타 내는지는 불확실하다.

Receptor-binding fusion sequence (E98-E111 AA) [11], predicted T-helper cell recognition sites (E426-E457 AA), potential N-glycosylation sites (E154-E156 AA) [12] 부분은 비교되어진 대부분의 일본뇌염 분리주들 사이에서 변이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1B). 또한 attenuation에 관련되었다고 추정되어진 (E138, E176, E270, and E333 AA) [28] 부분은 국내 분리주들의 아미노산 염기서열에서는 전혀 변이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1B).

6. Phylogenetic analysis

국내에서 분리된 5주의 분리주와 Nakayama를 비롯한 아시아 각 지역에서 분리된 일본 뇌염분리주의 envelope gene 염기서열을 이용하여 그들 사이의 유전적 관계를 조사하였다. PAUP 3.1.1 program을 사용하여 이들 사이의 maximum parsimony analysis를 분석한 결과 21주의 일본뇌

염 분리주는 Muar주와 나머지 주들로 크게 2개의 branch로 나뉘어졌다. Muar주를 제외한 나머지 주들은 다시 여러 개의 subgroup으로 나뉘어진다.

국내에서 분리된 5주는 K87P39와 나머지 다른 연도 분리주의 2개의 subgroup으로 분리되어지기 때문에 국내에는 최소한 2종류의 일본뇌염 바이러스의 genetic type이 있는 것으로 사료된다. 또한 Phylogenetic tree에서 국내 분리주들은 Nakayama주와는 완전히 다른 subgroup에 속하고 있다. 각 phylogenetic subgroup에 속하는 일본뇌염 분리주들은 지리적 위치나 분리된 host, virulence 등에 따른 특이점은 발견되지 않았다.

고 찰

일본뇌염 바이러스를 분리 지역 및 시기별, 또는 분리 유래별로 나누어 genotypic 및 phenotypic 특징을 확인하는 연구는 백신 후보주를 선정하는 일과, 바이러스 진화 연구 문제, monovalent 불활화 백신의 efficacy 문제 등에 중요한 정보를 제공할 수 있다 [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. 일본뇌염 분리주에 대한 변이는 1954년 polyclonal antibody를 이용하여 최초로 연구되었다 [21]. 그 이후 1980년대 들어 monoclonal antibody (MAbs)를 이용하여 일본뇌염 분리주들에 대한 항원성 및 immunotype에 따른 변이가 연구되었다. MAbs에 대한 hybridoma ascitic fluids를 사용하여 cross-hemagglutination 결과에 따라 group I (Nakayama), group II (JaGAr01), group III (Kamiyama and 691004), group IV (Nuar)로 나누거나 [14, 15], Nakayama주와 Beijing-1주로 크게 두 group으로 나누고 SA-14를 intermediate group으로 나누고 있다 [20]. 그러나 혈청학적 방법을 이용한 intratypic strain variation을 조사하는 것은 새로운 주들 사이의 항원성 차이의 정도를 정확하게 측정하기 힘들기 때문에 효과적인 방법이 아니다 [22]. 따라서 1990년대 들어 분자 생물학적 기법인 유전자 염기 서열법이 도입되어 이를 이용하여 바이러스 분리주들을 grouping하게 되었다. Chen 등 (1990, 1992)이 44개의 일본뇌염 분리주들 중 부분적인 prM 염기서열을 이용하여 4개의 group으로 나누었다. 본 연구진도 국내 분리주들의 부분적인 prM부분을 염기 서열하여 국내 분리주가 세 번째 group에 속하며 Nakayama주와 염기 서열 변이가 있음을 확인하였다. 그러

나 prM 염기서열을 이용한 subgrouping이 혈청학적 분류와 차이가 나고 있다 [7]. 따라서 일본뇌염 바이러스의 혈청학적 특징을 나타낸다고 알려진 envelope 부분의 염기서열을 분석하는 연구가 진행되었다. Ni 등 [13]은 13개의 분리주의 envelope 유전자를 이용하였고, Paranjpe 등 [23]은 20개의 분리주들의 envelope 염기 서열을 이용하여 phylogenetic grouping을 시도하였다. 이들이 사용한 grouping에는 국내에서 분리된 주들은 비교 분석 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 국내 분리주의 염기서열을 분석하여 아시아 다른 지역의 분리주와 비교하여 phylogenetic grouping을 실시 하였다. 이 결과에 따르면 국내에는 두 종류 이상의 유전적 차이가 있는 일본뇌염 바이러스 type이 존재하는 곳으로 추정되며 이 결과는 prM 부분의 염기서열 분석 결과와 일치하고 있다. 그러나 본 연구에서 나타난 phylogenetic tree 결과는 Ni 등 [13]과 Paranjpe 등 [23]의 결과와 일치하지는 않다. 이와 같은 차이의 원인은 phylogenetic tree가 dendrogram을 만들기 위해 사용한 algorithm이나 사용한 strain의 숫자, bootstrap 여부 등에 영향을 받기 때문이다 [23]. 본 연구에서는 Phylogenetic tree를 그리기 위하여 21개의 분리주를 이용하여 PAUP 3.1.1 (maximum parsimony analysis)을 활용하였으며, Ni 등 [13]은 13개의 분리주를 MEGA program (neighbour-joining analysis)을 이용하였으나 bootstrap을 하지 않았으며, Paranjpe 등 [23]은 PHYLIP(version 3.5c)와 MEGA를 이용하여 20개의 분리주를 사용하였다.

본 연구에서 만들어진 phylogenetic tree에 의해 나누어진 subgroup내의 바이러스주들은 지리적 위치 관계나, 분리된 host 또는 virulence와는 관계가 없었다. 이러한 결과는 Paranjpe & Banerjee (1996)의 결과와 일치하고 있다. 본 연구에서 만들어진 phylogenetic tree의 결과를 볼 때 국내에서 분리되는 일본뇌염 바이러스 분리주들은 현재 국내에서 불활화 백신 제조에 사용되고 있는 Nakayama-NIH주와 유전적으로 다른 주인 것으로 판명되어진다. 그러나 cross-HI test 결과를 볼 때 Nakayama주와 국내분리주에 대한 hamagglutination 항체가 국내 분리주에 대해서 대부분 비슷한 정도의 inhibition 효과를 보이고 있다. 따라서 현재 국내에서 사용중인 Nakayama주로 만든 불활화 백신이 국내분리주에 대해서 일정 정

도의 효과를 보이고 있는 것으로 생각되어진다. 즉 phylogenetic tree상에서 Nakayama주와는 완전히 다른 subgroup으로 나타나 유전 진화적인 차이가 있으나 항원성에 있어서는 큰 차이가 없음을 볼 수 있다. 그러나 일본뇌염 바이러스가 + RNA 바이러스이고 RNA 바이러스의 자연적 돌연변이율이 큰 점을 고려해볼 때, 또 국내에서 매년 자연계 매개 모기에서 일본뇌염 바이러스를 분리하고 있는 점을 감안할 때 Nakayama-NIH주와는 항원성이 완전히 다른 국내분리주가 생겨나 일본뇌염 바이러스의 급격한 발생 양상을 보여줄 가능성이 항상 존재하고 있다.

따라서 국내에서 제조되는 일본뇌염 바이러스 백신은 국내에 적합한 새로운 주를 선정하여 백신을 제조할 필요성이 존재하고 있으며 이를 위하여 cross-neutralization test 등 더 많은 연구가 필요하다.

결 론

국내에서 분리된 일본뇌염 바이러스 5주 (K96P10, K94P05, K91P05, K87P39, K82P01)를 사용하여 현재 국내 일본뇌염 불활화 백신의 제조에 사용되는 Nakayama주와 염기서열 (prM/M & envelope gene sequences)을 비교 분석하고 phylogenetic analysis를 이용하여 유전적 연관성을 관찰하였다. 또 국내 각 분리주에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 cross-hemagglutination inhibition test를 실시하여 국내 분리주와 Nakayama주와의 혈청학적 항원성의 관계를 조사하였다. Phylogenetic tree 결과에 의하면 국내 분리주는 Nakayama주와 다른 subgroup에 속하고 있는 것으로 보아 유전 진화적 특징은 다른 것으로 볼 수 있으며, 국내에는 최소한 2종류 이상의 유전적인 차이가 있는 분리주가 존재하고 있음을 확인하였다. 그러나 Cross-HI 실험 결과 Nakayama주와 국내 분리주들에 대한 항체가 Nakayama주 및 국내분리주들을 inhibition하는 것에 큰 차이가 없는 것으로 보아 혈청학적 항원성에서는 큰 차이를 보이고 있지 않으며 국내 분리주 상호간에도 항원성의 큰 차이는 보이지 않고 있다. Envelope gene 염기서열 비교에 따르면 국내 분리주들에 특이한 아미노산이 관찰되었다 (E89, E129, E221, E244, E327, E366, E459, E477). 이러한 결과로 볼 때 현재 사용중인 불활화 백신제조주

인 Nakayama-NIH주가 현재까지는 국내 분리주에 대해 효과를 보이고 있으나 앞으로 있을 가능성이 있는 유전적 변이를 감안할 때 국내에 적합한 새로운 주를 선정할 필요가 있다.

REFERENCES

1. Igarashi, A.: Epidemiology and control of Japanese encephalitis. World Health Stat Q 45(2-3), 299-305, 1992.
2. Kasahara S, Ueda M, Okamoto Y, Yashida S, Yamada R: Experimental study on Japanese encephalitis, 1, The passage and properties of virus, Tokyo 1 Shinish, 2954: 2806-2811, 1936.
3. Sabin AB, Schledinger RW, Ginder PR, Matsumoto M: Japanese B encephalitis American soldiers in Korea. Am J Hyg, 46:356-375, 1947.
4. Tsai TF, Yu YX: Japanese encephalitis vaccines, In plotkin SA, Mortimer EA, eds. Vaccines WA Saunders, 671-714, 1994.
5. 보건사회부 86 급성전염병 통계연보. 1:40 1, 1986.
6. Seinhauer DA, Holland JJ: Rapid evolution of RNA viruses, Ann rev Microbiol 41:409-433, 1987.
7. Chung YJ, Nam JH, Ban SJ, Cho HW: Antigenic and Genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea, Am J Trop med Hyg, 55(1):91-97, 1996.
8. Heinz, EX: Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. Advances in Virus Research. 31, 103-168, 1986.
9. Anderson, R, King, AD, Innis, BL: Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. Journal of General Virology 73, 2155-2159, 1992.
10. Clarke DH and Casals J: Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. Am J Trop Med Hyg 7:561-567, 1958
11. Mandl, CW, Guirakhoo, F, Holzmann, H, Heinz, FX, Kunz, C: Antigenic structure of the flavivirus envelope preprotein E at the molecular level, using Tick-borne encephalitis virus as a model. Journal of Virology. 63(2), 564-571,

- 1989.
12. Gritsun, TS, Holmes, EC, Gould, EA: Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research*. 35: 307-321, 1995.
 13. Ni, H, Barrett, DT: Nucleotide and deduced amino acid sequence of the structural protein genes of Japanese encephalitis viruses from different geographical locations. *Journal of General Virology*. 76, 401-407, 1995.
 14. Kobayashi, Y, Hasegawa, H, Oyama, T, Tamai, T, Kusaba, T: Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus by using monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*. 44, 117-123, 1985.
 15. Kobayashi, Y, Hasegawa, H, Yamauchi, T: Studies on the antigenic structure of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Microbiology and Immunology*. 29: 1069-1082, 1985.
 16. Banerjee, K. Certain characteristics of Japanese encephalitis virus strains by neutralization test. *Indian Journal of Medical Research*. 83, 243-250, 1986.
 17. Okuno, Y, Okamoto, Y, Yamada, A, Baba, K, Yabuuchi, H: Effect of current Japanese encephalitis vaccine on different strains of Japanese encephalitis virus. *Vaccine*. 5: 128-132, 1987.
 18. Chen, WR, Tesh, RB, RICO-HESSE, R: Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. *Journal of General Virology* 71: 2915-2922, 1990.
 19. Chen, WR, RICO-HESSE, R, Tesh, RB: A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 47: 61-69, 1992.
 20. Wills, MR, Sil, BK, Cao, JX, Yu, YX, Barrett, DT: Antigenic characterization of the live attenuated Japanese encephalitis vaccine virus SA14-14-2: a comparison with isolates of the virus converging a wide geographic area. *Vaccine*. 10: 861-872, 1992.
 21. Hale, LH, Lee, LH: A serological investigation of six encephalitis viruses isolated in Malaya. *British Journal of Experimental Pathology* 35: 426-433, 1954.
 22. Hasegawa, H, Yoshida, M, Shiosaka, T, Fujita, S, Kobayashi, Y: Mutations in the Envelope protein of Japanese Encephalitis virus Affect Entry into cultured cells and virulence in Mice. *Virology*, 191: 158-165, 1992.
 23. Paranjpe, S, Banerjee, K: Phylogenetic analysis of the envelope gene of Japanese encephalitis virus. *Virus Research* 42:107-117, 1996.
 24. Mcada, PC, Mason, PW, Schmaljohn, CS, Dalrymple, JM, Mason, TL, Fournier, MJ: Partial nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome. *Virology*. 158, 348-360, 1987.
 25. Sumiyoshi, H, Mori, C, Fuke, I, Morita, K, Kuhara, S, Kondou, J, Killkuchi, Y, Nagamatu, H, Igarashi, A: Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology*. 161: 497-510. 1987
 26. Nitayaphan, S, Grant, JA, Chang, Gwong-Jen J, Trent, DW: Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology*. 177, 541-552, 1990.
 27. Hasegawa, H, Yoshida, M, Fujita, S, Kobayashi, Y: Comparison of structural proteins among antigenically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*. 12: 841-84, 1994.
 28. Ni, H, Burns, NJ, Chang, G-J, J, Zhang, M-J, Wills, MR, Trent, DW, Sanders, PG, Barrett, DT: Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequence of the 5' non-coding region and structural protein genes of the wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14 and its attenuated vaccine derivatives. *Journal of General Virology*. 75: 1505-1510, 1994.