

한국에 산재하는 사람 Caliciviruses의 다양한 유전자군: 1987-1994년

한양대학교 의과대학 미생물학교실, ¹서강대학교 생명과학과

남기범 · 김지애 · 양재명¹ · 김경희

=Abstract=

Genotypic Variations among Human Caliciviruses in Korea: 1987-1994

Ki-Bum Nam, Ji-Aee Kim, Jai-Myung Yang¹ and Kyung-Hee Kim

¹Dept. of Life Science, Sogang Univ., Seoul 121-742, and Dept. of Microbiology, Hanyang Univ. College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

Sequence comparison of the RNA-dependent RNA polymerase of human caliciviruses (HuCVs) from Korean children with gastroenteritis revealed significant genetic variation among them. cDNA clones were produced from the HuCVs collected from pediatric population during a period of 1987-1994. The application of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers directed to the RNA-dependent RNA polymerase region within ORF1 of Norwalk virus (NV) showed that 13.7% of HuCVs yielded PCR products of similar size to the NV prototype, NV8Flla/68/US, with exceptions of HuCV185/87/Korea and HuCV1115/90/Korea. Computer analyses showed that the PCR products had a continuous protein encoding frame on the positive strand, and contained GLPSG and YGDD amino acid motifs at the predicted distance from primers. Alignment of the amino acid sequences of HuCVs with previously published sequences for Snow Mountain agent (SMA), NV, and Sapporo/82/Japan indicated that these strains can be divided into four major genogroups. There were 10 (45%) SMA-like CVs, one (4.5%) NV-like HuCVs, two (9%) Sapporo-like HuCVs, and nine (41%) unidentified HuCVs. This fourth genogroup should be investigated further. HuCV185/87/Korea and HuCV 1115/90/Korea, Sapporo-like CVs, were genetically distinct from previously characterized HuCVs and more closely related to known animal CVs. One of the animal CV-like strain, HuCV 185/87/Korea, showed nucleotide and amino acid homology of only 67% and 73% with the prototype Sapporo/82/Japan. Further characterization of animal and human CV genomes and studies of possible cross-transmission of CVs from animals to humans are likely to be beneficial in understanding the epidemiology of HuCVs.

Key Words: Human caliciviruses, RNA-dependent RNA polymerase, Gastroenteritis

서 론

Caliciviruses (CVs)는 서서히 인간 및 동물의 병

원체로 알려지면서 현재 활발한 분자 생물학적 연구에 의해 바이러스의 한 과 (family)로 그 자리를 확립해 가고 있다. 이전에 그 원인이 밝혀지지 않은 인간 및 동물의 장내 바이러스들이 점

본 연구는 96년도 교육부 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

차로 CVs로 알려지면서 이 바이러스에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 바이러스 연구에 필요한 바이러스 증식이 인공적으로 불가능하여 이를 위해 많은 세포 배양 기술이 도입되었지만 아직 그렇다 할 만한 결과를 얻지 못하고 있다 [1]. 그 결과 단편적으로 바이러스 지놈의 분자생물학 및 형태학적 특징을 연구하는 방향으로 보다 많은 실험이 진행되고 있다. 1990년대 이후로 Norwalk virus (NV)의 전체 지놈의 염기서열이 밝혀지면서 이러한 정보를 기초로 하여 다른 사람 및 동물 CVs의 염기서열이 알려지게 되었다 [2,3].

CVs의 지놈은 약 7,500의 염기 쌍을 갖는 단일 가닥의 양성 RNA로 되어 있으며 특징적으로 지놈의 3' 끝에 poly-A tail과 5' 끝에 단백질과 공유 결합되어 있다 [2,4~7]. 또한 3개의 ORF로 구성되어 있으며 첫번째 ORF의 특징은 다음과 같다. ORF1은 주로 바이러스의 비구조 단백질을 발현시키는 유전자들로 되어 2C helicase, 3C cysteine protease, 3D RNA polymerase로 구성되며 이는 동일한 방향으로 piconavirus와 같은 아미노산 motif 들이다 [8]. CVs는 1932년 남가주 지역에서 가축용 돼지로부터 처음 인식되어졌고, 1957년 feline hemorrhagic pneumonia의 원인체로 판명된 feline CV (FCV)가 분리되었다 [9-10]. CVs가 사람에게 감염될 수 있다고 하는 증거는 1970년 이후에 나타나게 되었는데 주로 전자 현미경 관찰로 인하여 급성 장염을 일으키는 환자의 실사 변에서 형태적으로 동물의 CV와 유사한 HuCVs가 발견되었다 [11]. 또한 CVs와 크기가 거의 비슷하지만 컵 모양 형태의 구멍 (32 cup-shaped surface)이 없으며 급성 장염의 원인체로 small round-structured viruses (SRSVs)가 알려졌다 [12,13]. 현재 전세계 곳곳에서 다수의 CVs와 SRSVs가 지놈의 ORF 1내 3D RNA polymerase 부위 (ORF^{pol})의 염기서열에 의해 그룹별로 분류되고 있다 [14]. 대체로 RT-PCR방법을 이용하여 cDNA 염기서열을 밝히는 것인데 이와 같은 까닭은 이 부위가 여러 CVs들 중에서 가장 염기서열 상동성이 높고, 개체간의 변이성이 적기 때문이다. 이와 같은 특징은 이전에 알려진 RNA polymerase부위 염기서열 정보를 가지고 RT-PCR을 위한 primer제작에 도움을 주게 된다 [15]. 사람 CVs는 유전학적으로 세 가지 종류로 분류되는데, 첫째 Norwalk-like 유전자 군으로 대표적인 NV가 있으며 둘째로 Snow

Mountain agent (SMA)-like 유전자군이고 마지막 이 Sapporo-like 유전자군이다 [14]. Sapporo-like 유전자군 중 prototype Sapporo/82/Japan의 염기서열이 다른 사람 CVs 보다 동물 CVs쪽에 가깝다고 알려져 있는 것이 흥미롭다 [16]. 또한 NV를 인위적으로 침팬치에 감염시켰을 때 이 바이러스가 복제되는 것으로 알려졌고, Sapporo strains이 토끼에 주입되었을 때 면역 반응을 유도하는 것이 관찰되었다 [17,18].

본 연구에서는 현재 바이러스 지놈의 염기서열에 따른 사람 CVs (human CVs, HuCVs)의 유전자군 중 한국에서 유행하는 CVs들의 상호 계통 유전학적 성질을 밝히고자, 1987~1994년 사이의 7년 동안 바이러스성 산발적 장염/설사로 서울 종합병원에 입원한 소아 환자들 중 357개 검체를 대상으로 HuCV RNA를 분리하고 이를 주형으로 하여 NV primer set을 선택하여 RT-PCR로 RNA 중합 효소의 cDNA를 합성하고 pMOS-Blue-T 벡터에 클론한 후 염기서열을 분석한 결과 특징적 동물 CVs인 FCV와 염기서열이 매우 유사한 Sapporo strain과 상당한 염기서열 상동성을 보인 환자 검체를 발견하였으며, 이러한 바이러스 검체를 이용하여 사람과 동물주 CVs들 간의 잠재적 유전성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

Viral RNA 추출을 위한 시료로는 1987년부터 1994년까지 7년동안 비 세균성 급성장염으로 서울 종합병원에 입원한 소아들 중 다른 바이러스 항원들에 음성을 나타낸 변 검체들을 대상으로 하였다. RNA 추출을 하고 남은 변 검체는 바이러스의 활성을 보존하기 위하여 -70℃에 보관하였다.

2. 변 검체로부터 HuCV RNA 직접 분리 정제

-70℃에 보관되어 있던 변 검체를 멸균된 3차 증류수로 1:5-1:10의 비율로 희석한 후 3,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 상층액과 동량의 trichlorotrifluoroethane (Genetron 113, Allied Chemical Corp., Morristown, NJ)를 진탕 혼합한 후 다시 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 350 µl에 2X polyethylene glycol-8000 (Sigma Chemical Co., St.

Louis, MO)을 넣고 진탕혼합한 후 4°C에서 30분간 방치하고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침사 (pelleting) 하였다. 여기에 1X proteinase K 용액 (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 12.5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 1% SDS) 300 µl를 넣어 pellet을 잘 풀후 10 mg/ml의 proteinase K (BRL, Grand Island, NY) 12 µl를 넣어 10초간 진탕하고 37°C에서 30분간 방치하였다. 여기에 10% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma) 50 µl와 4 M NaCl 50 µl를 첨가하여 진탕한 후 56°C에서 30분간 방치한 후 동량의 phenol-water-chloroform (Applied Biosystem Inc., Foster City, CA) 으로 1회 chloroform (International Biotechnologies Inc., New Haven, CT)으로 1회 추출하여 2.5 배의 100% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)과 1/10분량의 3 M sodium acetate (pH 5.2)를 섞어 -70°C에서 30분간 방치후 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전된 RNA를 25 µl의 DNAase, RNAase-free water (Promega, Madison, WI)로 56°C에서 10분간 녹인 후 5 µl를 RT-PCR 시료로 사용하였다 [15,19~21]

3. 시발체

HuCV ORF1^{pol} 부위에서 채택된 primer쌍 p36/p35 (470 bp), p36/p51 (404 bp), p3/p51 (206 bp), p36/p101M (110 bp)은 NV에서 유래한 것으로 Southampton virus (SHV) [6], NV [3], FCV [4], rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) [21] 등에서 발견되는 GLPSG의 아미노산 motif와 많은 positive-strand RNA viruses에서 발견되는 YGDD의 아미노산 motif를 포함하며 그 배열은 다음과 같다 (Fig. 1-A) [20]: p35 (-): 5'-CTTGTTGGTTT-GAGGCCATAT-3', p36 (+): 5'-ATAAAAGTTGG-CATGAACA-3', P51 (-): 5'-GTTGACACAATC-TCATCATC-3', p3 (+): 5'-GCACCATCTGAGAT-GGATGT-3', p101M (-): 5'-TTGCTGCGTGGAG-TCCCA-3'.

4. RT-PCR에 의한 HuCV ORF1^{pol} cDNA의 생산과 증폭

전회 [20,21]의 방법에 따라 CVs의 ORF1내 3D 지역의 cDNA 생산과 증폭을 위해 p36/p35 (470 bp), p36/p51 (404 bp), p3/p51 (206 bp), p36/p101M (110 bp)를 사용한 (Fig. 1-A) RT-PCR은 10x PCR 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500

mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 µl, 5 mM dNTP 혼합용액 4 µl, antisense primer (0.1 µg/µl) 2 µl, RNasin 0.25 µl (40 units/µl), avian myeloblastosis virus reverse transcriptase 0.25 µl (50 units/µl, Promega, Madison, WI)를 넣고 DNAase, RNAase-free water (Promega)로 전체 부피를 50 µl로 맞춰 42°C에서 1시간 반응시킨 후, 합성된 1차 cDNA 합성 용액 50 µl에 sense primer 2 µl (0.3 µg/µl), 10 x Taq DNA polymerase 완충 용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 µl, Taq DNA polymerase (5 µl/µl, Takara, Otsu, Shiga, Japan) 0.3 µl를 넣고 증류수로 최종 부피가 100 µl가 되도록 하여 94°C에서 1분간 열변성, 49°C에서 1분 20초간 annealing, 72°C에서 1분간 신장을 39회 실시하였다. PCR 산물을 전기영동후 ethidium bromide로 염색하여 470, 404, 206, 110 bp의 DNA 띠를 확인하였다.

5. RT-PCR 산물의 T-A cloning

470, 404, 206 및 110 bp의 DNA를 젤로부터 절단한 후 잔존하는 PCR primer나 dNTP, 효소활성을 없애기 위해 glass milk를 이용한 GeneClean II kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA)로 분리하고, 멸균된 증류수 6.5 µl에 녹였다. 정제된 6.5 µl RT-PCR products를 제조회사의 방법에 따라 10 x ligase 완충 용액 (300 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM MgCl₂) 1 µl, 100 mM DTT 0.5 µl, 10 mM ATP 0.5 µl, pMOSBlue T-vector (50 ng/µl, Amersham, Buckinghamshire, England) 1 µl T4 DNA ligase 0.5 µl (2-3 weiss units)를 넣고 16°C에서 12~16시간 동안 반응시켰다 (Fig. 1-B).

Ligation 반응 산물 1 µl를 pMOSBlue competent cell (Amersham) 20 µl에 넣어 잘 섞은 후 얼음물에 30분간 담가 두고 42°C수조에서 정확히 45초간 heat shock을 가한 다음 다시 얼음물에 2-3분간 방치하였다. 그후 상온의 SOC 배지 80 µl를 첨가시키고 37°C에서 1시간 동안 회전 진탕배양하였다. 배양액은 dimethylformamide에 50 mg/ml로 녹인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal, IBI) 35 µl와 100 mM의 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG, IBI) 20 µl가 깔린 LB-ampicillin 평판배지에 도포하고 37°C 배양기에서 12시간 배양하였다.

6. PCR에 의한 재조합 클론의 확인

약 12 시간 배양한 LB-ampicillin 평판배지의 집락으로부터 HuCV cDNA를 포함한 집락을 찾기 위해 PCR을 수행하였다. 멸균된 30 µl의 증류수에 하나의 흰색 집락을 micropipette tip으로 접촉한 후 잘 저어 부유 시켰다. 이 부유액 10 µl에 10X PCR 완충용액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 2.5 µl, 2.5 mM dNTP 혼합용액 2 µl, sense primer (30 pM), antisense primer (30 pM), *Taq* polymerase (5 units/µl, Takara) 0.125 µl를 넣고 DNAase, RNAase-free water (Promega)로 전체 부피를 25 µl로 맞춘 후 95°C에서 1분간 열변성 시켰다. 그 후 95°C에서 1분간 열변성, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 신장을 30회 실시한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. PCR 산물을 1% 아가로스겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 470, 404, 206, 110 bp의 DNA 띠가 확인된 시료는 ampicillin이 혼합된 LB 배지에 접종하여 sequencing 및 보관용 시료로 사용하였다.

7. cDNA의 염기 서열 결정

HuCV ORF1^{pol}부위를 가진 각 클론의 plasmid DNA를 분리하여 알칼리 변성법으로 변성시킨 후 dideoxy-mediated chain termination [19] 원리를 이용한 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB, Cleveland, OH)을 공급사의 사용 방법에 따라 염기 서열을 결정하였다. DNA sequencing에 필요한 primer는 vector내의 -40 forward primer와 T7 promoter primer를 사용하였다. Annealing은 annealing 혼합액을 65°C에서 2분 방치한 다음 약 30분간 온도를 30°C까지 내리면서 실시하였고, labeling 반응은 상온에서 3~5분간 실시하며 termination 반응은 37°C에서 5분간 실시하였다. Sequencing 반응에 α-³⁵S-dATP를 사용하여 DNA를 표지하고 7 M urea가 포함된 6% polyacrylamide gel에서 1,800 V로 4시간 이상 전기영동한 후 vacuum gel dryer (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, CA)로 건조시켰다. 건조된 젤을 -70°C에서 1~2일 X-ray film에 노출한 후 현상하여 PC/Gene program (IntelliGenetics Inc, Mountain View, CA)을 이용하여 염기서열 분석 및 아미노산 서열을 분석 하였다.

8. cDNA 염기 서열 분석

클론된 바이러스 cDNA들의 염기 서열 분석은 PC/Gene software, version 6.6 (IntelliGenetics Inc, Mountain View, CA)로 하였고 이들의 유전적 연관성의 분석은 Phylip (Phylogeny Inference package version 3.57c) program을 사용하였다. 이 분석에 사용된 국외 분리주들의 염기서열 자료는 EMBL/Gene Bank Data bases에 수록되어 있으며 accession number는 HuCV/NV/8FIIa/76/US (M87661), HuCV/SHV/91/UK (L07418), HuCV/SA-1283/84/Japan (L23832), Lonsdale/93/UK (X86557), SRSV/SMA/79/US (L23831), SRSV/TV24/91/Canada (U02030), SRSV/OTH25/89/Japan (L23829), FCV/F4/Japan (D31836), RHDV(AST/89)/Spain (Z49271) 과 같다.

결과 및 성적

1. 국내 소아 장염 환자의 변 검체에서 RT-PCR에 의한 HuCV cDNA생성

1987년부터 7년간 바이러스성 산발적 장염/설사로 서울 종합병원에 입원한 소아 환자들의 변 검체로부터 추출한 viral RNA를 주형으로 하여 NV ORF1^{pol} 부위에서 채택된 primer쌍들 p36/p35, p36/p51, p3/p51, p36/p101M을 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 470, 404, 206 및 110 bp의 길이를 가지는 cDNA가 합성되어짐을 아가로오스겔 전기영동을 통해 확인하였다. 총 검사한 357개의 변 검체 중 49개 (13.7%)가 RT-PCR에서 양성이었다.

2. 국내 HuCVs의 RNA polymerase부위의 유전적 다양성

49개의 RT-PCR 양성 검체 중 22개를 pMOS-Blue-T 벡터에 삽입하여 *E. coli*에 형질전환시키고 염기서열을 규명한 결과 각 cDNA의 양끝에는 RT-PCR primer의 염기서열이 존재하였으며 연속적인 단백을 번역하는 frame이 RNA 가닥위에 존재함을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 HuCV185/87/Korea를 제외한 모든 염기서열에서 SHV, NV, FCV, RHDV 등에서 발견되는 GLPSG와 positive-strand RNA virus의 RNA polymerase region에서 발견되는 YGDD의 아미노산 motif가 관찰되었다 (Fig. 2). 염기서열의 정확한 판독을 위하여 벡터

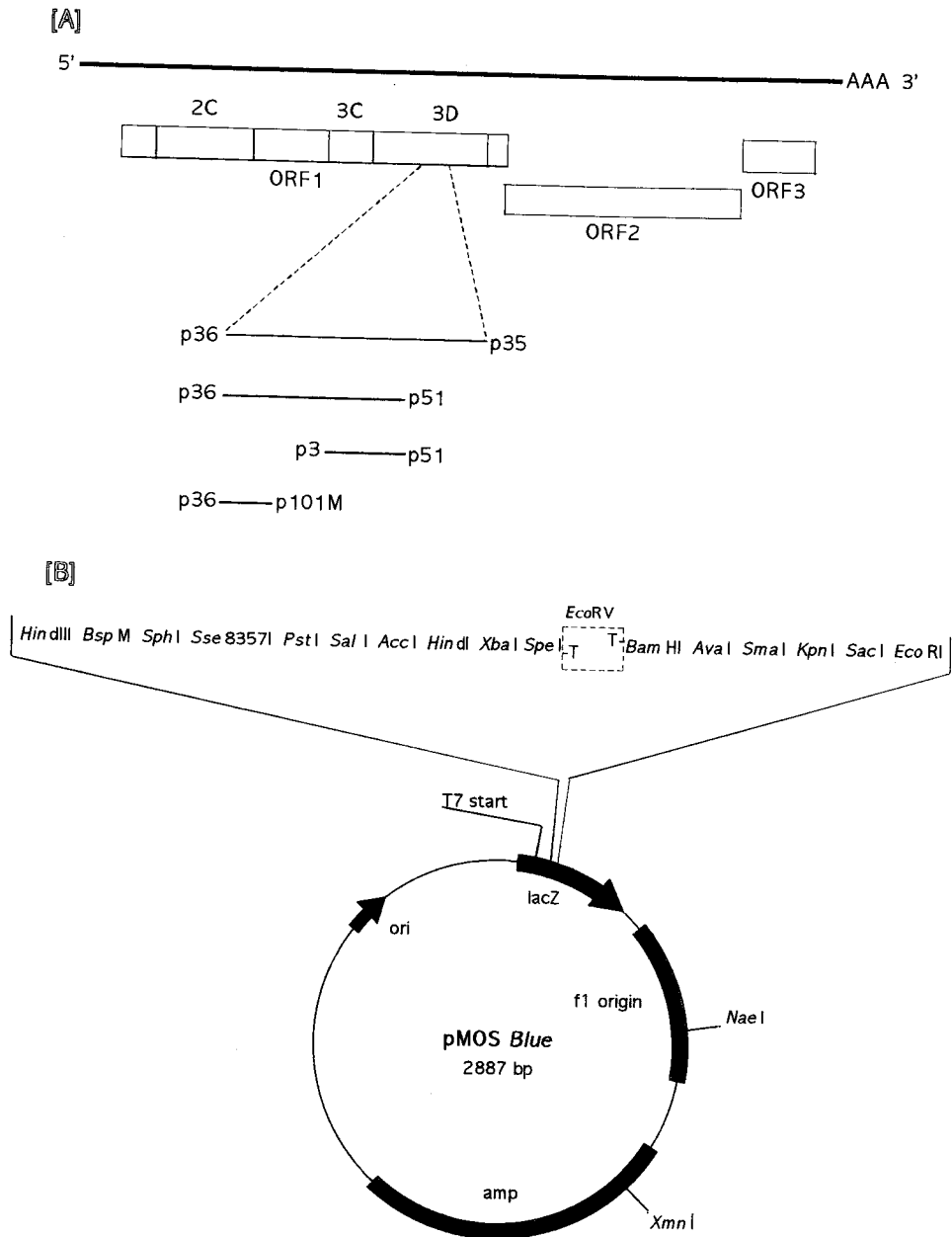


Fig. 1. [A] Alignment of HuCV genome and location of primer sets used. The first open reading frame encodes nonstructural proteins, the second encodes the capsid protein and the third encodes a presumptive non-structural protein. [B] Diagram of pMOSBlue T-vector used for cloning of RNA polymerase gene-derived RT-PCR fragments. The RT-PCR products were inserted into single thymidine-tailed *EcoRV* site.

내의 universal primer인 -40 forward primer와 T7 promoter primer로 양방향으로 읽어갔다. 그 결과 SMA 유전자군에 속하는 것이 10개 (45%)로 가장 많았으며, Sapporo 유전자군에 속하는 것이 2개 (9%), NV 유전자군에 속하는 것이 1개 (4.5%)였고 그외의 어떠한 군에도 속하지 않는 9개

(41%)를 본 연구에서는 제 4의 유전자군으로 분류하였다 (Fig. 3).

이중 HuCV2046a/92/Korea와 HuCV2047b/92/Korea는 같은 환자에서 하루 차이를 둔 변 검체에서 분리된 것으로 염기/아미노산 서열의 상동성이 완전히 일치하는 100%로 나타났는데 반해

HuCV185/88/Korea VMMMDSTQV EVLNEKDG V-W-CLDYS KWDSTQHPAV TAASLAIER LSEATPITTS AVELLSSPAR GHUNDLIVT KSLPSEMPF TSWGSDNHM TYFAAVLKA YEDHAPYTG NVFQWEVHT -Y-ED-
 HuCV1115/90/Korea . . . I . . . V . M . Q . M . D . . . L N FA . PH . VSC . I . A . . . E . YV . . K . . . RG N . I . Q . I . V . . I . Q . . S . NV G
 Sapporo/82/J . . . I . . . V . M . Q . M . D . . . L N FA . PH . VSC . I . A . . . E . YV . . K . . . RG N . I . . I . V . . I . Q . . S . NV G
 SapporoDCC/86/US . . . I . . . V . M . Q . M . D . . . L N FA . PH . VSC . I . A . . . E . YV . . K . . . RG N . I . . I . V . . I . Q . . S . NV G
 FCV/F4/J - . I PE YORI . SA . AK . F . AV . F . N S . R . S ID RY . F . DES VD ANI . K PI . AIF . GVAVKV . A L IN C . M . VCC . I . QS . L . ARQI . V . W . L . SSSPDM G
 RHDV (AST89)/Spain - . VD . T . RD . D . IINN . TSK . ASDFE MS . C . VRLAID . AD . CC . Q . EL . K . V . LT . K . HEM . TL . DAM . VO R IN . IC . W . LUS Y . S . CAEL . LHCS - . LYEDAFY G
 NV8FIIa/68/us TTEDGP . LIYAEHAK - . YKHFDA T . A NRQT . MTE . FS . MS TASPETAEV . VAQD . LA . SE . MONG . YVIRV . KE VFP . CTSQMSI . D NITLCL . IS . E . - . TELSP . D . V . SMSYFS . F . G EIVS

Fig. 2. Comparison of the predicted amino acid sequence for RNA polymerase gene-derived PCR fragments of HuCV185/87/Korea, HuCV1115/90/Korea, Sapporo/82/Japan, SapporoDCC/86/US, FCV/F4/Japan, RHDV (AST89)/Spain, and NV8FIIa/68/US. Dots represent residues identical to HuCV185/87/Korea. The conserved motifs GLPSG and YGDD are underlined and letters denote differences in amino acids. Amino acids 1-132 correspond to amino acids 1446-1577 of ORF1 of NV.

Table 1. Relationships of Sequences of the RNA Polymerase Region among Human and Animal Caliciviruses^a

	<i>SapporoDCC</i>	1115	185	F4	RHDV ^b	SMA ^c	NV ^d
<i>Sapporo/82/Japan</i>	100	99	73	48	37	36	33
<i>SapporoDCC/86/US</i>		99	73	48	37	36	33
HuCV1115/90/Korea ^e			74	46	36	35	30
HuCV185/87/Korea				46	41	30	35
<i>FCV/F4/Japan</i>					39	31	30
<i>RHDV (AST/89)/Spain</i>						35	28
<i>SMA/76/US^f</i>							60

Note. ^a The amino acids 1444 - 1577 of the polymerase region of ORF1 of NV-8FIIa were compared with similar sequences among the indicated.

^b RHDV, Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (AST/89)/Spain.

^c SMA, Snow Mountain Agent (SMA/76/US).

^d NV, Norwalk virus (NV8FIIa/68/US).

^e 127 residues from the amino acids 1451-1577 of the polymerase region were compared.

^f 132 residues from the amino acids 1446-1577 of the polymerase region were compared.

2개월이 지난 후 동일 환자에서 분리한 HuCV 2188c/93/Korea에서는 92%의 염기 및 95%의 아미노산 서열의 상동성이 나타났다. 또한 HuCV/2448a/93/Korea와 HuCV/2458b/94/Korea는 약 1주일간의 시간을 두고 한 환자에서 채취한 검체들로 2개의 염기염쌍이 서로 바뀌어, 염기서열 분석 결과 99%의 염기 및 아미노산 서열이 일치하는 것으로 나타났다.

SMA 유전자군에 속하는 국내 분리주들은 HuCV/1858/92/Korea, HuCV/1800/92/Korea, HuCV/1134/90/Korea, HuCV/1261/90/Korea, HuCV/1170/90/Korea, HuCV/KD58/90/Korea, HuCV/2047b/92/Korea, HuCV/2046a/92/Korea, HuCV/1942/92/Korea, HuCV/2188/93/Korea로 SMA와의 염기 및 아미노산 서열 상동성은 각각 78~83% 및 90~97%를 나타냈다 (Fig. 3). NV 유전자군에 속하는 것은 HuCV/1819/92/Korea로 NV 유전자군의 SHV와 염기 및 아미노산 서열 상동성이 96%와 100%

를 나타내었고 NV와는 81%와 96%였다 (Fig. 3). 본 연구에서 처음 밝혀진 HuCV/1115/90/Korea [20]와 HuCV/185/87/Korea는 동물 CV와 유사한 Sapporo유전자군이었으며 1982년 일본 Sapporo시의 한 고아원에서 발병한 소아 환자의 변검체에서 분리된 Sapporo/82/Japan과의 염기 및 아미노산 서열의 상동성이 각각 92% 및 99%와 67% 및 73%로 나타났다 (Fig. 3). 이 균주들 중 HuCV 185/87/Korea는 HuCV1115/90/Korea에 비교할 때 prototype Sapporo agent와 낮은 homology를 나타내었으며 p36/p51 primer쌍을 이용한 RT-PCR 산물의 염기서열 분석 결과 예상되는 404 bp와는 달리 특이하게 413 bp의 염기서열이 읽혔으며, HuCV/1115/90/Korea는 p35/p36 primer쌍을 이용할 때 예상되는 470 bp의 염기 보다 12 bp가 많은 482 bp의 염기서열 읽혔다. 또한 염기서열의 변이가 높아 세가지 유전자군에 속하지 않는 HuCV 699/89/Korea, HuCV875/90/Korea, HuCV2290/93/

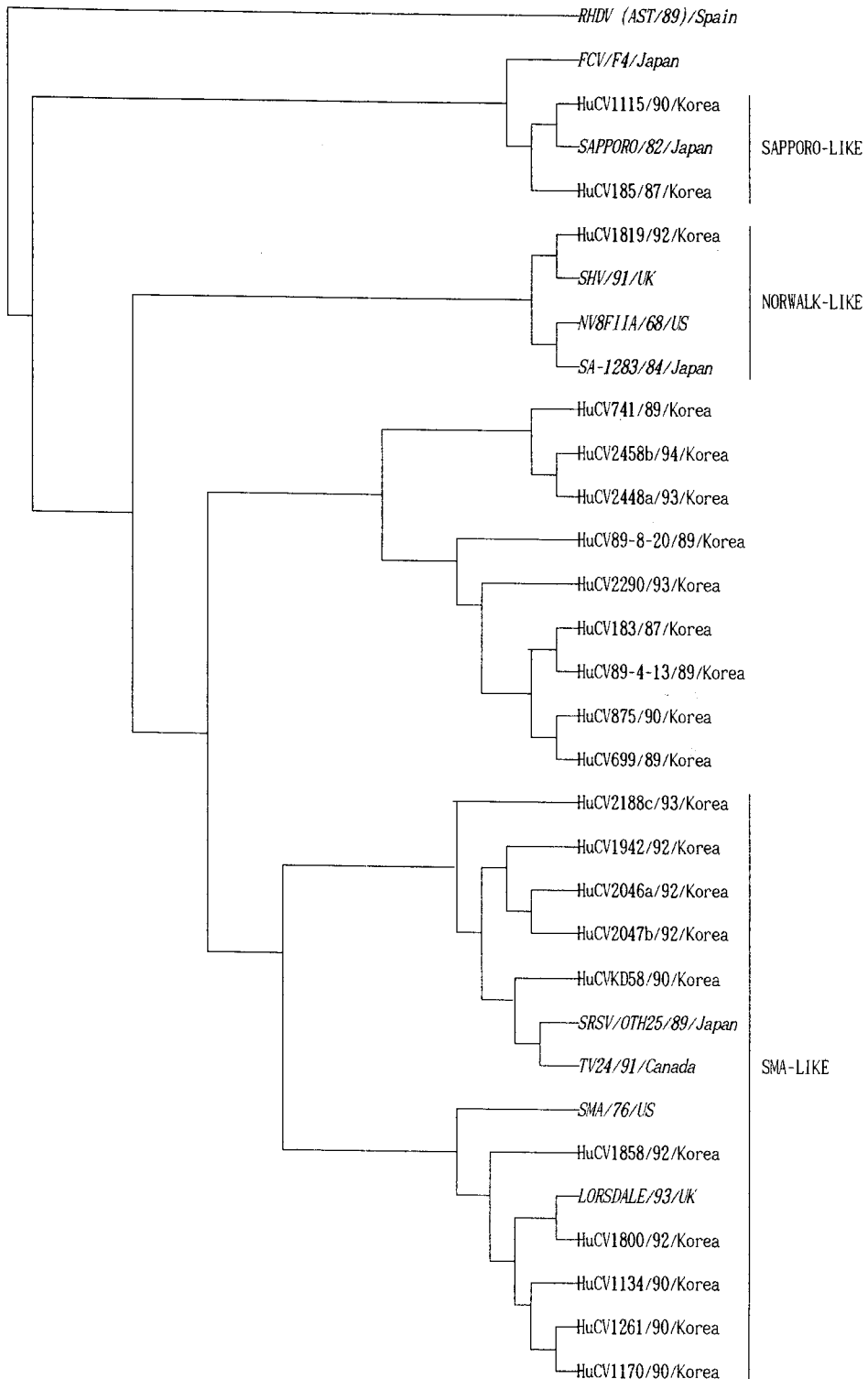


Fig. 3. Dendrogram of the predicted amino acid sequences from the 3D region of selected human and animal CVs. The dendrogram was generated with phylip software program (Phylogeny Inference package ver. 3.57c). The reference for each of the caliciviruses is from our laboratory and from EMBL/GenBank Data bases.

Korea, HuCV2448/93/Korea, HuCV2458/94/Korea, HuCV2290/93/Korea, HuCV89-4-13/89/Korea, HuCV183/90/Korea 및 HuCV89-8-20/89/Korea들도 탐지되었는데 NV와의 염기 및 아미노산 유사도가 각각 65~70%와 56~67%였으며 SMA와는 염기 및 아미노산 유사도는 68~73%, 62~80%였다 (Fig. 3). 이러한 특이 유전자군의 염기 및 아미노산 서열의 상동성이 NV와 SMA 유전자군중 SMA 유전자군에 좀더 가까운 것으로 나타났지만, 계속적인 연구로 이와같은 변이주들의 분류학적 위치를 다시 정립할 필요가 있겠다.

3. 동물주와 유사한 한국형 HuCV들의 염기 서열상 특징

사람 CVs들과 유전학적인 특성이 다른 HuCV/185/87/Korea와 HuCV1115/90/Korea들은 예상되는 RT-PCR 산물의 크기보다 9 bp 및 12 bp씩 더 크게 나타났으며 RNA지놈위에 연속적인 아미노산 frame이 존재하였고 GLPSG와 YGDD의 아미노산 motif가 존재하는지를 알아본 결과 두 균주 모두에서 어떠한 stop codon이 없는 연속적 reading frame이 읽혀졌다 (Fig. 2). 그러나 HuCV185/87/Korea에서는 YGDD의 아미노산 motif대신 YDD의 아미노산 서열이 읽혀 G의 염기쌍이 deletion된 것을 확인할수 있었다 (Fig. 2). 이는 사람 CV와 상이한 지놈구조를 갖는 동물 CV의 특징으로 생각되어지며 이 바이러스 전체 지놈의 염기서열을 밝혀내 확인해 봐야할 과제이다.

고 찰

현재 CVs를 분자 생물학적 방법으로 감지할 때 가장 많이 쓰이는 방법으로는 바이러스 지놈의 ORF1^{pol}부위의 consensus sequence를 이용한 RT-PCR 방법이다 [15]. 그 결과 생성된 cDNA의 염기서열을 분석하여 CV 균주간 유전적 변이성을 조사하거나 변이성이 상당히 심한 특이한 균주를 동정하는데도 사용되어진다. 양성 가닥의 RNA 바이러스는 자기 복제를 위하여 RNA polymerase를 요구하며 그 결과 바이러스 지놈내에 이러한 효소를 표지 시키는 유전자를 갖게 마련이다 [24]. 이러한 점을 이용해 RNA 지놈을 갖는 바이러스를 연구하는 학자들이 이러한 RNA polymerase부위에서 어떤 유전적 연관성이 있으며 내부에 각 바이러스 사이에서 유사한 지역을 찾

으려고 노력하였으며 그 결과 일치되는 아미노산 motif를 찾기도 하였다. 이와같은 사실의 바탕에는 지놈내 3D RNA polymerase부위가 CV 지놈내에서 유전적 변이성이 가장 적기 때문이기도 하다. CVs를 연구하는 많은 학자들이 CV 전체 지놈의 염기서열을 알고자 많은 노력을 하였으나 실험초기의 cDNA 생성자체에서부터 문제가 일어나고 있다. 이는 부정당한 primer의 사용 때문이기도 하지만 현재 보다 중요한 원인으로 CV 지놈의 자체적 구조 때문으로 알려져 있다. CV의 RNA 지놈내에는 2차 구조를 많이 가지고 있어 RT-PCR시 1차 cDNA의 합성이 중지되기 쉽다 [25].

본 실험에서는 CVs간의 유전학적 변이성과 새로운 변종의 생성여부를 알고자 한국에서 유행되는 사람 CVs의 ORF1내 RNA polymerase부위를 NV 유래의 primer쌍으로 RT-PCR한 결과 각각 예상했던 크기의 cDNA를 확인할수 있었다. 총 검사한 357개의 변 검체 중 49개 (13.7%)가 RT-PCR에서 양성이었는데 이는 음성으로 나온 환자들이 CV에 노출되지않아 viral RNA자체가 없어 RT-PCR에 의해 cDNA가 잡히지 않을 경우와 viral RNA는 존재해도 사용된 NV유래의 primer쌍과의 homology가 없거나 약해 primer가 주형 가닥에 결합하지 못하여 생긴 경우를 생각하여 볼수 있다. 한 검체에 서로 다른 primer쌍으로 RT-PCR을 실행 했을 때 어느 한 primer에서는 양성 반응을 나타내고 다른 primer쌍들에서는 음성 반응이 나온 경우를 볼수 있었는데, 이와 같은 결과에서는 CVs에 감염되지 않은 것이 아니라 주형 가닥에 대한 primer의 특이성이 없었던 것으로 볼수 있다. 즉 이러한 검체는 NV의 염기서열과 유전학적 연관성이면 균주로 생각할수 있으며, 이러한 검체에서 생성된 cDNA의 염기서열을 이용하면 아직 분자생물학적 특성이 알려지지 않은 HuCVs이나 RT-PCR에서 음성으로 나온 검체에서 최초의 cDNA를 얻는데 유용할수 있다고 하겠다.

RT-PCR에서 양성반응이 나온 49개의 HuCV cDNA중 부분적 염기서열이 밝혀진 22개 HuCVs의 염기서열을 비교하여 보았을때 SMA 유전자군에 속하는 것이 10개 (45%)로 가장 많았으며, Sapporo 유전자군에 속하는 것이 2개 (9%), NV 유전자군에 속하는 것이 1개 (4.5%)였고 그외의 9개 (41%)가 위의 3가지 유전자군에 속하지 않는

제 4 유전자군이었다 (Fig. 3). 이와 같이 세가지의 유전자군 및 제 4 유전자군이 한국에서 유행한다는 것은 CV 감염이 지역적으로 국한되지 않고 전세계적으로 유행한다는 것을 재확인 할수 있다 [20,21,26,27]. 더욱 흥미로운 사실은 HuCV 1115/90/Korea와 HuCV185/87/Korea의 균주들이 이전 FCV 및 RHDV와 같은 동물 균주와 상동성이 매우 높다고 알려진 Sapporo/82/Japan와 각각 99%, 73%의 아미노산 서열 homology를 나타낸 것이다 (Table 1). 이와 같은 결과는 동물에게 감염을 일으키는 CVs와 우연히 RNA polymerase부위의 염기 서열이 일치했을 경우와 실제 동물 CVs에 사람이 감염되어 일어날 수 있을 것이다. 동물 CV균주들 중에는 여러 가축들에 감염을 일으키는 넓은 숙주 범위를 가지고 있는 균주들이 있다. 그 한 예로 실제 실험실 연구원이 San Miguel sea lion virus serotype 5에 감염된 경우가 알려졌다 [9]. 이는 이들 지놈내 ORF1^{pol}부위를 유전자 재조합 기술로 *E. coli*나 baculovirus expression system에서 발현시킨 후 [22,28], Western blot이나 EIA와 같은 방법 등의 혈청학적 분석 [29]을 통해 밝혀질 수 있으며 또한 바이러스 입자의 분리가 가능하다면 여러 동물에 인위적인 감염을 통해 바이러스 복제의 여부를 확인할 수도 있다.

현재 이러한 연구를 위해 본 실험실에서 HuCV 1115/90/Korea 및 HuCV185/87/Korea의 ORF1^{pol} 부위를 *E. coli*나 baculovirus expression system에서 발현시켜, 이러한 제조법 단백을 이용하여 다양한 HuCV를 탐지하려는 작업을 준비중이다.

결 론

체계적인 세포배양 기술이 아직 확립되지 않았으며 또한 지놈내 특정 부위의 클로닝을 위한 cDNA생산의 어려움 등 많은 문제점에도 불구하고 CVs에 대한 연구가 끊임없이 활발히 일고 있는 이유는 사람에게 급성장염을 일으키는 여러 원인체중 이 바이러스가 큰 비중을 차지 하고 있다는 것을 학자들이 점차로 인식하고 있기 때문이다. CV에 대한 백신 개발은 둘째 치고라도 바이러스 감염을 확인하고 어떠한 geno/serotype인지를 밝힐수 있는 장치가 필요하다. 현재 CVs로 분류되는 여러 균주들이 알려졌으며 이들의 분자생물학 및 형태학적 특성들이 일부 밝혀졌다.

특히 CV 지놈내 RNA polymerase부위의 염기쌍의 상동성을 비교하여 3개의 유전자군으로 분류하고 이들 유전자군내의 특성 및 유전자군 사이의 연관성을 찾으려고 노력하였다 [14]. 이와같은 3개의 유전자군은 SMA 유전자군, NV 유전자군 그리고 Sapporo 유전자군으로 각군마다 염기서열상 특징적인 성질을 가지고 있으며 현재 CVs들의 유전자군들을 결정짓는 기본적 틀이 되고 있다. 현재 한국에서 유행하고 있는 CVs의 유전자군을 결정짓고 그에 따른 유전자군 분포를 조사하기 위해 급성장염을 일으켜 서울 종합병원에 입원한 소아 환자의 변 검체에서 CV viral RNA를 추출한 후 RT-PCR로 지놈내 ORF1^{pol} 부위의 cDNA를 합성하여 클로닝한후 염기서열을 분석한 결과 SMA 유전자군 (45%), Sapporo 유전자군 (9%) 그리고 NV 유전자군 (4.5%) 및 3가지 변이주들이 관찰 되었으며, 또한 어떠한 유전자군에도 포함되지 않은 제4군의 변이주들이 41%나 나왔다. 특히 동물 CVs와 염기서열 상동성이 높다고 알려진 Sapporo/82/Japan 균주와 아미노산 서열이 73% 비슷한 HuCV/185/87 균주가 국내에서 처음 발견되었다. 이러한 변이주는 사람 CV가 개체간의 passage를 통한 생활사의 계속되는 반복에서 일어나는 RNA 지놈상의 돌연변이라고 보다는 다른 동물 및 사람에게 상호감염을 일으키는 CV일 가능성이 높다고 생각되어지며 이를 확인하기 위하여 실험을 준비중이다.

참 고 문 헌

1. Green SM, Diggle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: Human enteric *Caliciviridae*: a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 75: 1883-1888, 1994.
2. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes MK: Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580-1583, 1990.
3. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195: 1-11, 1993.
4. Ryoko O, Yukinobu T, Yaysshi K, Keizo T, Ken M, Nakazu T, Etsuko U, Chieko K, Takeshi M: The molecular cloning and sequence of

- an open reading frame encoding for non-structural proteins of feline calicivirus f4 strain isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 56: 1093-1099, 1994.
5. Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN: Human enteric *Caliciviridae*: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76: 2349-2355, 1995.
 6. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259: 516-519, 1993.
 7. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Springer-Verlag, Vienna, Austria, 1995.
 8. Bruenn JA: Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 19: 217-226, 1991.
 9. Barlough JE, Berry ES, Skilling DE, Smith AW: The marine calicivirus story. *Compend Contin Educ Pract Vet* 8: F5-14, F75-82, 1986.
 10. Fastier LB: A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res* 18: 382, 1957.
 11. Madeley CR, Cosgrove BP: Caliciviruses in man. *Lancet* 2: 199-200, 1976.
 12. Cubitt, WD, Blackow NR, Hermann JE, Nowak NA, Nakata S, Chiba S: Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. *J Infect Dis* 156: 806-814, 1987.
 13. Schaffer FL: Caliciviruses. p249-284. *In* Nayak D, (ed.), *Comprehensive virology* vol 14. Plenum Press Inc., New York, 1979.
 14. Dinulos MB, Matson DO: Recent developments with human caliciviruses. *Pediatr Infect Dis J* 13: 998-1003, 1994.
 15. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK: Detection of Norwalk virus in stool using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 2529-2534, 1992.
 16. David OM, Wet-Ming Z, Shuji N, Numata K, Jiang X, Larry KP: Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol* 45: 215-222, 1995.
 17. Schaffer FL: Caliciviruses. *Compr Virol* 14: 249-284, 1979.
 18. Matson DO, Estes MK, Glass RI: Human calicivirus-associated diarrhea in children attending day care centers. *J Infect Dis* 159: 71-78, 1989.
 19. Kim, Kyung H: Small, round-structured virus in Seoul: determination of its importance and direct sequencing of a genome. *J Kor Soc Virol* 25: 23-28, 1995.
 20. Kim, Kyung H, Xiang, X: Norwalk-like viruses, a common cause of sporadic acute gastroenteritis in Korean children. *J Kor Soc Microbiol* 31: 227-235, 1997.
 21. Han, Dong P, Kim, Ji A, Yang, Jai M, Kim, Kyung H: Human caliciviruses in Korea: a new prevalent group defined by RNA-dependent RNA polymerase diversity. *J Kor Soc Virol* 27: 1-8, 1997.
 22. Beatrice B, Christoph W, Maria S, Grego M, Heinz-Jurgen T, Cesare R: Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 68: 6487-6495, 1994.
 23. Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 444, 1975.
 24. Eugene VK: The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 72: 2197-2206, 1991.
 25. Tamie A, Stephan SM, Jacqueline SN, Glass RI: A one-tube method of reverse transcription-PCR to efficiently amplify a 3-kilobase region from the RNA polymerase gene to the poly (A) tail of small round-structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Clin Microbiol* 35: 570-577, 1997.
 26. Cubitt, WD, Jiang XJ, Wang J, Estes MK: Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *J Med Virol* 43:

- 252-258, 1994.
27. Judy FL, Martin P, Albert ZK, Jiang X, Estes MK, Kim YG: Identification of Minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* 68: 3391-3396, 1994.
28. Yang, Jae M, Chang Mi Y, Kim, Kyung H: Expression and antigenicity of replicase protein from Snow Mountain-like caliciviruses, Korean isolates. *J Kor Soc Virol* 27: in press, 1997.
29. Kang, Shin J, Nam, Ki B, Cho, Yang J, Kim, Kyung H: Seroprevalence of Norwalk-like viruses (NLVs) in Seoul: Detection using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Kor Soc Virol* 27: in press, 1997.
-