

한타바이러스 호왕균주의 M, S 유전자 절편의 염기서열 및 분자생물학적 특성

아산생명과학연구소 바이러스과
주 옹 규 · 이 호 왕

=Abstract=

Molecular Characterization of a New Hantaan Virus Howang Strain

Yong-Kyu Chu and Ho-Wang Lee

Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-040, Korea

Hantaan virus Howang strain which isolated from the blood of severe case of Korean hemorrhagic fever is more virulent than HTN 76/118 and showed different RFLP from partial PCR amplified M genome segment to established Hantaan serotype viruses. We have determined the nucleotide sequence of the M and S genome segments and compared to HTN 76/118. The M and S segment of Howang strain has 3615 and 1696 nucleotides long, respectively. The M segment sequence of Howang strain is one nucleotide shorter than HTN 76/118. The sequence data of Howang strain shows 93.5% homology to HTN 76/118. One long open reading frame, which starts from 41nt. to 3448nt. of the M segment and from 37nt. to 1326nt. of the S segment, exist to on complementary sense of the virus genome. There are no significant difference between HTN 76/118 and Howang strain on hydrophobicity of deduced polypeptides, but has slight difference on secondary structure.

Key Words: Hantavirus, Hantaan virus Howang strain, Sequence of the M and S segment

서 론

한타바이러스는 분야비리과에 속하며, 3분절로 이루어진 단선구조의 negative-sense RNA를 유전자로 가지는 크기가 약 100 nm 정도의 소형 바이러스이다 [1]. 한타바이러스는 유라시아 대륙의 신증후출혈열과 미주대륙의 한타바이러스 폐증후군의 병원체로 잘 알려져 있다. 현재까지 많은 수의 한타바이러스 균주들이 신증후출혈열 환자 및 한타바이러스 폐증후군 환자의 혈액 및 조직으로부터 및 이 바이러스의 자연계 숙주동물인 비단털쥐과 (Family *Cricetidae*)와 쥐과 (Family *Muridae*)에 속하는 많은 종의 설치류의 폐장조직

본 연구는 아산생명과학연구소의 96-117과제 연구비 지원 및 1996년도 과학기술처 선도기술개발사업 4-2-14과제 연구비 지원으로 이루어 졌음

으로 분리된 바 있다 [2, 3]. 현재까지 사람에게 질병을 일으키는 것이 확인된 한타바이러스 혈청형, 서울바이러스 혈청형, 벨그레이드바이러스 혈청형, 푸말라바이러스 혈청형, 신넴브레바이러스 혈청형, 블랙크리카날바이러스 혈청형과 그 병원성이 아직 밝혀지지 않은 프로스펙트힐 바이러스 혈청형, 타이바이러스 혈청형 그리고 쏘타팔리암바이러스 혈청형 등 모두 9개의 혈청형이 알려져 있으며, 각각의 혈청형에 속하는 바이러스에 따라 숙주동물을 달리한다 [2, 3]. 한국형출혈열 및 극동아시아에서 발생하는 신증후출혈열의 병원체인 한타바이러스는 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)의 폐장조직 및 환자의 혈액 및 조직에서 분리되었으며 [4], 전세계의 동물실험실 및

도시지역의 집쥐와 접촉하여 발생하는 신증후출혈열의 병원체인 서울바이러스는 집쥐 및 실험용 흰쥐의 폐장조직으로부터 분리되었고 [5], 유럽의 발칸반도 유역의 국가들에서 발생하는 중증의 신증후출혈열의 병원체인 벨그레이드 바이러스가 노란목들쥐 (*Apodemus flavicolis*) 및 환자의 혈액에서 분리되었다 [6]. 미주대륙에서 발생하는 한타바이러스가 폐증후군의 병원체인 신놈브레 바이러스는 미국의 들쥐인 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)와 환자에서 분리되었고 [7], 미국 플로리다유역의 목화쥐 (*Sigmodon hispidus*)와 그 지역의 환자에서 분리되었다 [8].

전세계적으로 매년 20만명 이상의 신증후출혈열환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며 [9] 우리나라의 경우 매년 약 1,000명 가량의 신증후출혈열환자 발생이 보고되고 있으며 한탄혈청형 바이러스와 서울혈청형 바이러스에 의한 것으로 알려져 있다 [10]. 한탄혈청형 바이러스에 의하여 발생하는 신증후출혈열은 중증의 임상증상을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 서울혈청형 바이러스에 의한 신증후출혈열은 한탄혈청형 바이러스에 의한 임상증상보다 가벼운 증상을 나타내는 것으로 알려져 있다.

호왕균주는 1990년 중증의 임상증상을 나타내어 사망한 한국형출혈열 환자의 초기혈액을 Vero E6 조직배양세포에 계대배양하여 분리한 바이러스이다. 호왕균주는 기존의 한타바이러스 보다 병원성이 강하여 성체 마우스의 뇌내에 접종하였을 때 뇌염증상을 나타내어 사망하게 하였다. 또한 호왕균주의 M유전자절편을 추출하여 연쇄효소 중합방법을 사용하여 증폭시킨 상보핵산을 몇가지 특히 제한효소로 절단하였을 때 기존의 한탄혈청형 바이러스와 다른 양상을 나타내는 것을 볼 수 있었다 [11].

본 연구에서는 기존의 한탄혈청형 바이러스들과 다른 양상을 나타내는 호왕균주의 대, 중, 소 3 유전자 절편중 중간크기와 작은 크기의 2 유전자 절편의 염기배열을 분석하여, 이미 알려져 있는 한탄혈청형 바이러스들의 염기배열과의 차이를 분석하여 비교하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 핵산 추출

중증의 신증후출혈열환자 혈액으로부터 분리

된 호왕균주들 Vero E6 (Vero C1008, ATCC CRL 1586)에서 8% 우태아 혈청과 Penicillin 100 units/ml과 Streptomycin 100 µg/ml이 함유된 Eagle's minimal essential medium (EMEM)으로 10일간 배양하였다. 25 cm³ 조직배양용기에 배양된 세포에 감염된 호왕균주의 전체 RNA를 추출하기 위하여 Trizol™ (GIBCO BRL, Grand Island, NY)을 사용하였다. 호왕균주에 감염된 조직배양세포를 인산완충용액 (pH 7.4)으로 두 번 세척한 후 5 ml의 Trizol™ 을 넣은 후 cell scraper를 사용하여 배양기 표면의 감염세포를 녹인 다음 1.5 ml microfuge tube에 1ml씩 분주하였다. 분주된 용액은 얼음수조에서 10분간 놓아둔 다음 200 µl의 chloroform을 분주하여 잠시 vortexing하여 잘 섞은 후 얼음수조에서 10분간 놓아둔 후 4°C 20분간 원침시킨 후 상층액을 수확하여 동량의 isopropanol과 섞은 혼영하 80도 냉동고에서 1시간 놓아 두었다. 4°C 에서 30분간 원침시킨 후 침전된 RNA는 70% 에틸알코올로 세척한 수 RNase가 없는 증류수에 용출시켰다.

2. 역전사 및 연쇄효소 중합반응

일차 상보 DNA는 한타바이러스속의 M, S segment의 3' 말단부위와 모든 혈청형 바이러스들에서 잘 보존이 되어 있는 부위로부터 선택한 특이적인 oligonucleotide primer와 SuperScript™ 역전사효소 (GIBCO BRL, Grand Island, NY)를 사용하여 합성하였다.

M segment 3부분으로 나누어 연쇄효소중합반응으로 다량의 상보 DNA를 합성시켰다. MFR primer (5'> TAGTAGTAGACACCGCAA <3')를 사용하여 합성된 M segment 당단백질 G1 유전자 부위 상보DNA는 MFR primer와 G1R primer (5'> GCACITGCAGCCCA <3')를 사용하여 연쇄효소 중합반응으로 다량의 상보DNA를 합성하였으며, M segment 당단백질 G2 유전자 부위 상보DNA는 G2F1 primer (5'> TGGGCTGCAAGTGC <3')와 MFR primer를 사용하여 연쇄효소중합반응으로 다량의 상보DNA를 합성하였다. G1부위와 G2부위 사이의 상보DNA를 합성하기 위하여 MF1383 primer (5'< TGCAACGGGCAGAGGAAAGT <3')를 사용하였으며, MF1383 primer와 MR2987 primer (5'> AACCCACACCTGAACCCCA <3')를 사용하여 연쇄효소중합반응을 실시하였다.

S segment는 2 부분으로 나누어 연쇄효소중합

반응으로 다량의 상보DNA를 합성하였다. SFR primer (5'> TAGTAGTAGTATGCTCCCTAA <3')와 SF789 primer (5'> AGCTTCTTCCAGATACAG <3')를 사용하여 일차 상보DNA를 합성하고 SFR primer와 S6B primer (5'> AGCTCAGGATCCATATCATC <3'), 그리고 SF789 primer와 SFR primer를 사용하여 연쇄효소중합반응으로 다량의 상보DNA를 합성하였다.

3. 클론제작 및 염기서열 분석

연쇄효소 중합반응으로 증폭된 상보 DNA는 TA cloning vector (Invitrogen, Netherland)를 사용하여 클론을 만들었다. 합성된 클론은 competent *E. coli* INV α F' (Invitrogen)세포내로 형질전환시켰다. 벡터플라스미드내 함유하고 있는 lacZ gene 발현유무에 따라 선택하였으며, 선택된 플라스미드 벡터는 제한효소로 절단하여 벡터내 삽입된 바이러스 유전자의 크기를 확인한 후 바이러스 염기서열 분석을 하였다. 벡터내 삽입된 바이러스 유전자의 염기서열을 분석하기 위하여 [α -S³⁵] dATP (DuPont NEN, Boston, MA)와 di-deoxy chain termination 방법을 이용한 T7 sequencing kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 사용하였다. 방사성동위원소로 표식된 DNA를 6% urea-polyacrylamide gel상에서 전기영동한 다음 autoradiography를 실시하였다. 중첩되게 합성된 상보DNA의 염기서열을 분석하기 위하여 양방향으로 염기서열을 분석하였으며, 적어도 2개 클론의 염기서열을 조사하였다. 호왕균주의 염기서열 분석은 DNASIS (Pharmacia) 프로그램을 사용하여 이미 알려진 여러 종류의 한탄형질 바이러스의 M분절과 S분절의 염기서열과 비교하였다.

결과 및 성적

1. 호왕균주 M segment 염기서열 분석

호왕균주의 M segment는 모두 3,615개의 염기로 이루어져 있으며 (그림 1), 한탄바이러스 76/118[12]과 비교하여 하나의 염기가 빠져있는 것을 볼 수 있었으며, 약 93.5%의 상동률을 나타내고, 서울바이러스 80-39균주 [13]와는 69.6%의 상동률을 푸말라바이러스 Hällnäs균주 [14]와는 44.1%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 호왕균주의 M segment의 open reading frame (ORF)는 한탄바이러스 76/118과 동일하게 하나의 긴

ORF를 바이러스 상보핵산에 가지는 것을 확인하였으며 (그림 2), 이 ORF는 41-43번 염기의 ATG codon으로 부터 3,446-3,448번째의 TAG codon으로 이루어져 있으며, 모두 1,135개의 아미노산 또는 약 126.6 KDa의 단백질을 표지하는 것을 볼 수 있었다. 호왕균주의 M segment에서 추정되는 아미노산은 76/118균주와 97.1%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 단백질은 다른 한탄 바이러스들과 동일하게 cysteine 아미노산의 함량이 높은 편으로 약 52.%(60개)의 cysteine 아미노산을 함유하는 것을 볼 수 있었다. 염기서열 분석으로 추정되는 아미노산의 N-glycosylation 부위는 모두 7개로 한탄바이러스 76/118균주와 동일한 위치에 가지고 있었으며, G1부위에 5개 그리고 G2부위에 2개의 부위를 가지는 것을 볼 수 있었다. 다른 한탄바이러스와 동일하게 G1과 G2당단백질의 아미노기 말단은 일련의 험수성 아미노산들로 이루어져 있으며 있는 것을 볼 수 있었으며, G2부위의 카복실기 말단의 아미노산들은 일련의 긴 험수성 아미노산들로 이루어져 있어 막에 단단히 달라붙는 것으로 추정할 수 있다. 호왕균주의 M segment에서 추정되는 M segment에서 추정되는 아미노산들의 험수도를 한탄바이러스 76-118균주과 비교하였을 때 거의 동일한 양상을 나타내었으나, 생성되는 단백질의 2차원적 구조를 비교하였을 때, 두 균주간에 약간의 차이가 있음을 볼 수 있었다 (그림 3).

2. 호왕균주 S segment 염기서열 분석

호왕균주는 S segment는 한탄바이러스 76/118균주 [15]와 동일하게 모두 1696개의 염기로 이루어져 있으며 (그림 4), 두 균주 사이에 약 94%의 상동률을 나타내었고, 서울바이러스 80-39균주 [13]와는 63.9% 그리고 푸말라바이러스 Hällnäs균주 [16]와는 42.1%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 호왕균주 S segment의 ORF도 M segment 와 동일하게 하나의 긴 ORF를 바이러스 상보핵산에 가지는 것을 확인하였으며 (그림 5), 이 ORF는 37-39번 염기의 ATG codon으로부터 1,324-1,326번째의 TAA codon으로 이루어져 있으며, 429개의 아미노산 또는 48.1 KDa의 단백질을 encode하는 것을 볼 수 있었다. 호왕균주 S segment로 부터 추정되는 아미노산을 한탄바이러스 76/118균주와 비교하여 약 97.2%의 상동률을 나타내었으며, 생성되는 아미노산의 험수도를 비

10	20	30	40	50	60	70
TAGTAGTAGA	CACCGCAAAA	GAAAGCAGTC	AATCAGCAAC	ATGGGGATAT	GGAAGTGGCT	AGTGATGGCC
80	90	100	110	120	130	140
AGTTTAGTAT	GGCCTGTTTT	GACACTAAGA	AATGTCTATG	ACATGAAAAT	TGAGTGTGCC	CACACAGTAA
150	160	170	180	190	200	210
GTTTCGGGGA	AAACAGTGTG	ATAGGGTATG	TGGAATTACC	CCCAATGCCA	TTGGCTGACA	CAGCACAGAT
220	230	240	250	260	270	280
GGTGCCTGAG	AGTTCCTGCA	GCATGGATAA	TCACCAATCA	TAAATACAA	TCACGAAATT	TACCCAAATA
290	300	310	320	330	340	350
AGTTGGAGAG	GAAAGGCTGA	TCAGTCACAG	TCTAGTCAAA	ATTCATTTGA	GGCAGTGTCT	ACTGAAGTTG
360	370	380	390	400	410	420
ACTTGAAAGG	AACATGTGTT	TTGAAACACA	AGATGGTGGG	GGAATCATAC	CGCAGTAGAA	AATCAATAAC
430	440	450	460	470	480	490
CTGTTATGAC	TTATCTTGTA	ATAGCACTTA	CTGCAAGCCA	ACACTATACA	TGATTGTACC	AATTCATGCA
500	510	520	530	540	550	560
TGTAATATGA	TGAAAAGTTG	TTTGATTGCA	TTGGGACCAT	ACAGAGTGCA	GGTAGTTTAT	GAGAGAAGTT
570	580	590	600	610	620	630
ACTGCATGAC	AGGAGTCCTG	GTTGAAGGAA	AATGCTTTGT	CCCAGATCAA	AGTGTGGTCA	GTATTATTAA
640	650	660	670	680	690	700
GCACGGGATC	TTTGATATTG	CAAGTGTTCA	CATTGTATGT	TTCTTTGTGG	CAGTTAAAGG	GAATACTTAT
710	720	730	740	750	760	770
AAACTTTTTG	AACAGGTTAA	GAAATCCTTT	GAATCAACAT	GCAATGATAC	AGAGAATAAA	ATACAAGGAT
780	790	800	810	820	830	840
ATTATATCTG	TATTGTAGGG	GGAAACTCTG	CACCAATATA	TGTTCCAACA	CTTGATGATT	TCAGGTCCAT
850	860	870	880	890	900	910
GGAGGCATTT	ACAGGAATTT	TTAGATCACC	ACACGGAGAA	GACCACGATC	TGCCCGGAGA	GGAAATTGCA
920	930	940	950	960	970	980
TCTTATTCTA	TAGTCGGACC	TGCCAATGCA	AAAGTTCCCT	ATAGTGCTAG	CTCAGATACA	TTGAGCCTGA
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
TTGCTTATTC	AGGTATACCA	TCTTATTCTT	CCCTTAGCAT	CCTAACAAGT	TCAACAGAAG	CTAAACATGT
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
ATTCAGCCCT	GGGTTGTTC	CAAAGCTTAA	CCACACAAAT	TGTGATAAGA	GTGCTATACC	ACTCATGTGG
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
ACCGGGATGA	TTGATTTACC	TGGATACTAT	GAAGCTATCC	ACCCTTGCAC	AGTTTTTTGC	GTATTGTTCAG
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTCTGGGGA	CATCTGTGAG	GCCTTTTCTG	AAGGCGGGAT	TTTTAACATA	ACCTCCCCTA	TGTGCTTAGT
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
GTCAAAGCAA	AATCGATTCC	GGTTAACAAA	ACAGCAAGTG	AATTTCTGTT	GTCAGCGGGT	GGACATGGAC
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
ATTGTTGTGT	ACTGCAACGG	GCAAAGGAAA	GTTATATTAA	CAAAAACTTT	AGTTATTGGA	CAATGTATAT
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
ATACTATAAC	AAGCTTATTT	TCATTACTAC	CTGGAGTAGC	ACATTCTATT	GCTGTTGAAT	TGTGTGTACC
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
TGGATTCCAC	GGATGGGCCA	CAGCTGCTCT	ACTTGTTACA	TTCTGTTTTG	GATGGGTTCT	TATACCAGCA
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
ATCACATTTA	TCATACTAAC	AATTCTAAAG	TTCATCGCCA	ATATTTTCCA	CACAAGTAAC	CAAGAAAATA
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
GGCTAAAATC	AGTACTTAGA	AAAATAAAGG	AAGAGTTTGA	AAAAAAAAAA	GGTTCAATGG	TGTGTGATAT
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
CTGGAAGTAT	GAGTGTGAAA	CCTATAAAGA	ATTAAAGGCA	CATGGGGTTT	CATGTCTTCA	ATCTCAATGT
1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
CCTTACTGTT	TTACACATTG	TGAACCCACA	GAAGCAGCAT	TCCAAGCTCA	TTACAAGGTA	TGCCAAGTCA

1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
CTCACAGATT	CAGGGATGAC	CTAAAGAAAA	CTGTCACTCC	TCAGAACTTC	ACACCAGGAT	GTTACCGTAC
1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
ACTGAATTTA	TTTAGATACA	AAAGTAGGTG	TTACATCTTT	ACAATGTGGA	TATTTCTCCT	TGTCCTAGAA
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
TCTATACTGT	GGGCTGCAAG	TGCATCAGAG	ACACCATTGA	CTCCTGTATG	GAATGATAAT	GCCCATGGGG
2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
TAGGTTCTGT	TCCTATGCAT	ACAGATTTAG	AACTTGATTT	CTCCTTAACA	TCCAGTTCCA	AGTACACATA
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170
TCGTAGGAAG	TTAACAAACC	CACTTGAGGA	AGCACAAATCC	ATTGATCTAC	ATATTGAGAT	AGAAGAACAA
2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
ACAATTGGTG	TTGACGTACA	TGCTCTAGGG	CACTGGTTTG	ATGGTCGTCT	CAACCTCAA	ACATCCTTTC
2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
ACTGTTATGG	TGCTTGTAACA	AAGTATGAAT	ACCCCTGGCA	TACTGCAAAG	TGCCACTATG	AAAGAGATTA
2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380
TCAGTATGAG	ACAAGTTGGG	GTTGTAACCC	ATCAGATTGT	CCTGGGGCGG	GCACAGGCTG	TACAGCATGT
2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450
GGTTTATACC	TAGACCAACT	AAAACCAGTT	GGTAGTGCTT	ATAAAATCAT	CACAATAAGG	TATAGCAGGA
2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
GAGTCTGTGT	TCAATTTGGA	GAGGAAAACC	TTTGTAAGAT	AATAGACATG	AATGATTGTT	TTGTATCTAG
2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590
GCATGTTAAG	GTCTGTATAA	TTGGTACAGT	ATCTAAATTC	TCTCAGGGTG	ATACATTGTT	GTTTTTTGGG
2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660
CCACTGGAAG	GTGGTGGTCT	AATATTTAAA	CACTGGTGTA	CATCCACATG	TCAATTTGGT	GACCCAGGAG
2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
ACATCATGAG	TCCAAGAGAC	AAAGTTTTTT	TGTGCCCTGA	ATTCCCAGGC	AGTTTCAGGA	AAAAATGCAA
2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
CTTTGCTACT	ACCCCTATTT	GTGAGTATGA	TGGAAATATG	GTTTCAGGTT	ATAAGAAGGT	GATGGCAACA
2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870
ATTGATTCAT	TTCAATCTTT	CAATACAAGC	ACTATGCACT	TTACTGATGA	AAGGATAGAG	TGGAAAGACC
2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940
CTGATGGAAT	GCTAAGGGAC	CATATAAACA	TTTTAGTAAC	AAAGGACATT	GACTTTGATA	ACCTTGGTGA
2950	2960	2970	2980	2990	3000	3010
AAATCCTTGT	AAGATTGGCC	TACAAACGTC	TTCTATTGAG	GGAGCCTGGG	GTTCTGGGGT	GGGTTTACA
3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080
TTAACATGTC	TGGTGTCACT	AACAGAATGT	CCCACCTTTT	TAACCTCAAT	AAAGGCTTGT	GATAAAGCCA
3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150
TCTGTTATGG	TGCAGAGAGT	GTAACATTAA	CAAGAGGACA	AAATACAGTC	AAGGTATCAG	GGAAAGGTGG
3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220
CCATAGTGGT	TCAACATTTA	AGTGTGTGCA	TGGGGAGGAC	TGTTCCGAGG	TCGGGCTCCA	TGCTGTGCA
3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290
CCTCACCTCG	ACAAGGTCAA	TGGGATTTCT	GAGATAGAAA	ATAGTAAAGT	ATATGATGAT	GGAGCACCGC
3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360
AATGTGGAAT	AAAATGTTGG	TTTGTTAAAT	CAGGGGAATG	GATTTACAGG	ATTTTCAGTG	GTAATTGGAT
3370	3380	3390	3400	3410	3420	3430
TGTACTCATT	GTCTCTGTG	TATTCTATT	GTTTTCAATG	GTGTTGCTAA	GCATTCTCTG	TCCTGTTAGG
3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500
AAACATAAAA	AATCATAGCT	ACACGGTGTC	ACTATCCCAT	TATTGTGTAT	AGCTTTAACA	TATATACTAA
3510	3520	3530	3540	3550	3560	3570
TTTTTGTATT	CCAATATACT	CTATCTAACA	CACTAAAAAA	AATAGTAGCT	TTCTAACCAC	AAAACTTAGA
3580	3590	3600	3610			
TTTTTCTTCT	GTATGATGTC	TTAACATCTG	CGGAGTCTAC	TACTA		

Fig. 1. Nucleotide sequence of the M genome segment of Hantaan virus Howang strain.

File : HW M Seq Range : 1 - 3615

Initiation Codon : ATG

Termination Codon : TAA, TAG, TGA

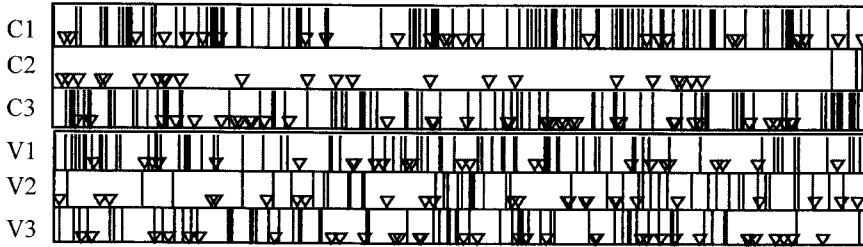


Fig. 2. Open reading frame of the M genome segment of Hantaan virus Howang strain.

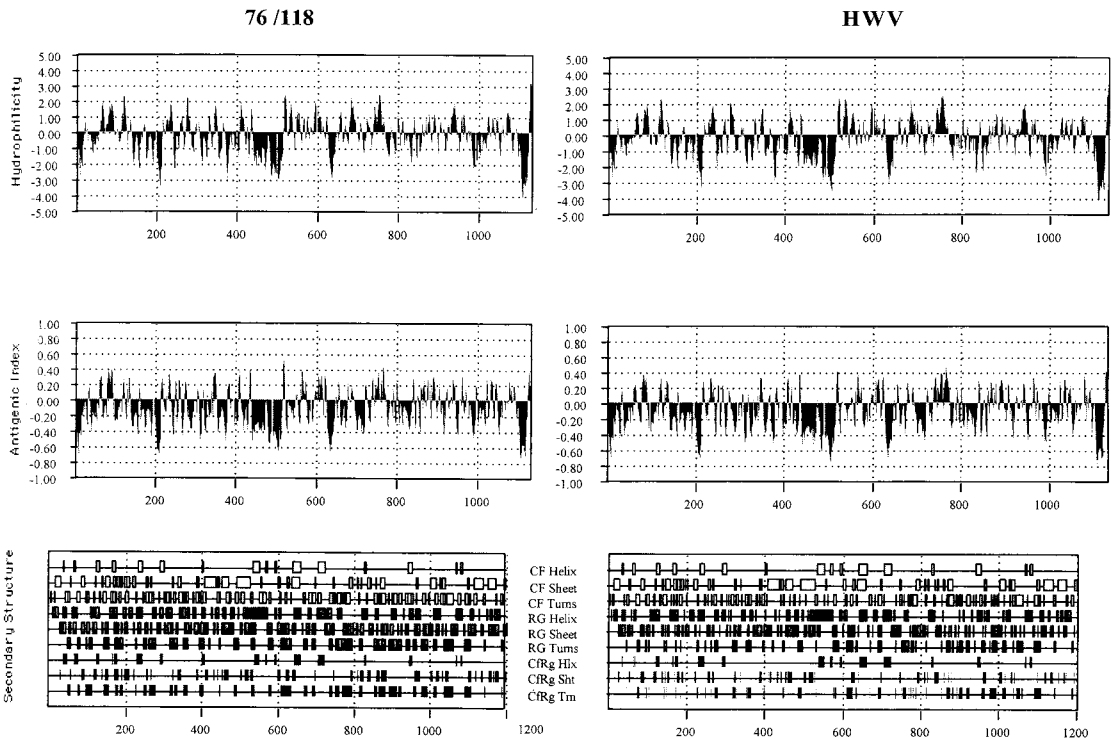


Fig. 3. Comparison of the hydrophobicity, antigenic index and secondary structure of the deduced amino acids from the M segment of HTN 76/118 and Howang strain.

교하여 본 결과 두 바이러스수가 거의 동일한 양상을 나타내는 것을 볼 수 있었으나, 생성되는 단백질의 2차원적 구조 및 항원도에서 약간의 차이가 있음을 볼 수 있었다 (그림 6).

고 찰

우리나라의 경우 매년 약 1,000명의 신증후출혈열환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 주

요 병원체는 한탄혈청형 바이러스와 서울혈청형 바이러스인 것으로 알려져 있다 [10]. 원인바이러스에 따라 숙주동물이 달라 한탄혈청형 바이러스의 경우 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)가 숙주동물인 것으로 알려져 있고 [4], 서울바이러스의 경우 집쥐나 실험용 흰쥐 (*Rattus norvegicus*)가 자연계 숙주동물인 것으로 알려져 있다 [5]. 우리나라에서 등줄쥐 및 환자혈액에서 분리된 한탄혈청형 바이러스의 경우 균주사이의 염기서열의

10	20	30	40	50	60	70
TAGTAGTAGA	CTCCCTAAAG	AGCTACTAGA	ACAACGATGG	CAACTATGGA	GGAATTACAG	AGGGAAATCA
80	90	100	110	120	130	140
ATGCCACGA	GGGTCAATTA	GTGATAGCCA	GGCAGAAGGT	GAGGGATGCA	GAAAAACAGT	ATGAAAAGGA
150	160	170	180	190	200	210
TCCAGATGAG	TTGAACAAGA	GAACATTAAC	GGACCGAGAG	GGTGTTCGAG	TATCTATTCA	GGCAAAGATT
220	230	240	250	260	270	280
GATGAGTTAA	AAAGACAGCT	GGCAGACAGG	ATTGCAACTG	GGAAGAACCT	TGGGAAGGAA	CAGGATCCAA
290	300	310	320	330	340	350
CAGGGGTAGA	GCCTGGAGAC	CACCTGAAAG	AGAGATCAAT	GCTTAGTTAT	GGCAATGTAC	TGGATTTAAA
360	370	380	390	400	410	420
CCACTTGGAT	ATTGATGAAC	CTACAGGACA	GACAGCAGAC	TGGCTGAGCA	TTGTTGTCTA	TCTTACATCC
430	440	450	460	470	480	490
TTTGTGTCC	CAATACTTCT	GAAAGCCCTG	TATATGTTAA	CAACAAGAGG	GAGGCAGACC	ACCAAGGACA
500	510	520	530	540	550	560
ACAAAGGAAC	CCGATTTCGA	TTTAAGGATG	ATAGCTCATT	TGAGGATGTT	AACGGTATTC	GAAAACCAAA
570	580	590	600	610	620	630
ACATCTTTAC	GTGCCTTGC	CAAATGCACA	GTC AAGTATG	AAGGCAGAAG	AGATTACACC	TGGCAGATAT
640	650	660	670	680	690	700
AGGACAGCAG	TCTGTGGACT	CTACCCTGCA	CAGATCAAGG	CAAGGCAAAT	GGTCAGTCCA	GT CATGAGTG
710	720	730	740	750	760	770
TAATTGGTTT	TCTGGCATTG	GCGAAAGATT	GGAGTGATCG	TATTGAGCAA	TGGTTGAGTG	AACCCTGCAA
780	790	800	810	820	830	840
GCTTCTTCCA	GATACAGCGG	CAGTCAGCCT	CCTCGGTGGT	CCTGCAACAA	ACAGGGACTA	TTTACGGCAG
850	860	870	880	890	900	910
CGGCAAGTTG	CATTAGGCAA	TATGGAGACA	AAGGAGTCAA	AGGCTATACG	CCAGCATGCA	GAAGCAGCTG
920	930	940	950	960	970	980
GCTGTGGCAT	GATTGAAGAT	ATTGAGTCAC	CATCATCAAT	ATGGGTATTT	GCTGGAGCAC	CAGACC GTTG
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
TCCACCAACA	TGCTTGT TTA	TAGCAGGCAT	TGCCGAGCTT	GGGGCATTTT	TTTCCATCTT	ACAGGATATG
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
CGAAATACAA	TCATGGCATC	TAAGACAGTT	GGGACATCCG	AGGAGAAGCT	GAGGAAAAAA	TCATCATTCT
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
ACCAGTCTTA	TCTCAGGAGG	ACACAATCAA	TGGGAATACA	ACTGGACCAA	AGAATCATTG	TGCTCTTCAT
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
GGTTGCCTGG	GGAAAGGAGG	CTGTAGACAA	CTTCCACTTA	GGGGATGATA	TGGATCCTGA	ACTGAGGACA
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
CTGGCACAGA	GCTTGATTGA	TGTCAAGGTG	AAGGAAATCT	CCAACCAAGA	GCCTTTAAAA	CTCTAATTAA
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
TGAATGTATT	AACCCTTTTA	TGTGATTAGC	ATATACTACT	GAATCATTAT	CAATCATATT	TACTACTATCA
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
TTATCAGGGG	AATCATTATA	TCAGGGTAAG	GGAACATTTA	TGGGTGGGAA	TCATTACTCA	AGGGTGGGCC
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
AGTTAATCCG	TTGTGGGTGG	GTTTAGTTCC	AGGCTGCCTT	AAGTAGCCTT	TTTCTGTATA	TATGGATGTA
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
GATTTCA TTT	GATCCTTAAC	TAATCTTGCT	TTCTTTCCCT	TTCTTTCTGC	TTTCTCTGCT	TACTAACAAC
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
AACATTCTAC	CTCAACACAC	AACTACCCCA	ACTTAACTAC	CTCATTTGAT	TGCTCCTTGA	TTGTCTTTTT
1690						
AGGGAGCATA	CTACTA					

Fig. 4. Nucleotide sequence of the S genome segment of Hantaan virus Howang strain.

File : HWS
 Mode : Normal Range : 1 - 1693
 Initiation Codon : ATG
 Termination Codon : TAA, TAG, TGA

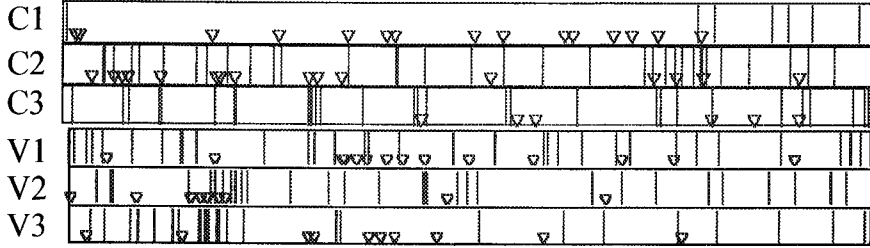


Fig. 5. Open reading frames of the S genome segment of Hantaan virus Howang strain.

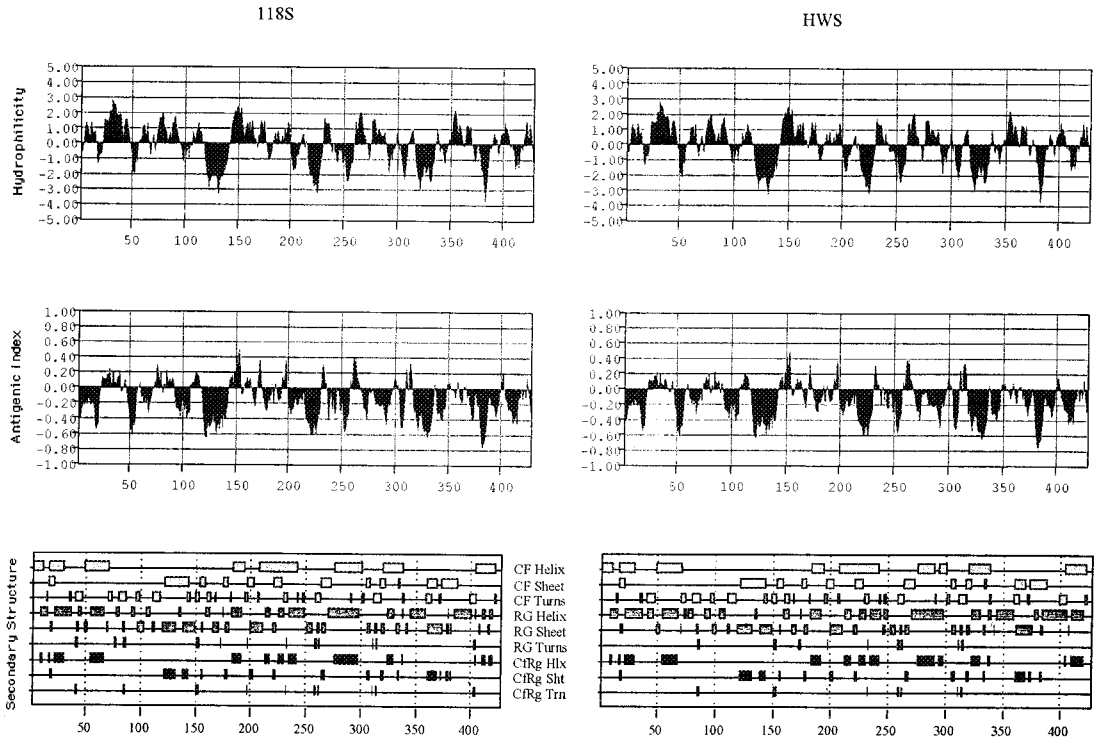


Fig. 6. Comparison of the hydrophobicity, antigenic index and secondary structure of the deduced amino acids from the S segment of HTN 76/118 and Howang strain.

차이는 2-3%에 불과한 것으로 알려져 있다 [17]. 서울바이러스의 경우에서도 우리나라와 일본 및 중국의 집쥐에서 분리된 서울혈청형 바이러스들 사이에서의 염기서열의 차이는 약 5%에 불과할 뿐인 것으로 알려져 있다 [13, 18, 19]. 그러나 현재 우리나라에서 신증후출혈열의 유행지역으로 알려진 충북구지방에서 발생한 중증의 한국형출혈열 환자의 혈액에서부터 분리된 호왕균주는 기존에 분리된 한탄혈청형 바이러스들과 약 6%

의변이를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

최근 미국의 들쥐인 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리된 바이러스들 사이에 유전적인 변이가 심하고 각각의 제논 절편들의 유전적 재조합이 일어난다는 보고가 있었다 [20]. 그러나 호왕균주와 76/118균주 사이의 염기서열의 차이는 각각의 유전자 절편에서 거의 근사한 값을 나타내고 있으므로, 유전적 재조합에 의한 새로운 바이러스라고 볼 수는 없다. 그러나 차후 호

왕균주가 분리된 유행지역에는 76/118 유사균주가 함께 존재하고 있으므로 우리나라의 자연계 숙주동물인 등줄쥐 사이에서 두 종류의 차이가 있는 바이러스 사이에서의 유전적 재조합이나 변이가 있을 가능성은 배제할 수 없다고 하겠다.

종래 등줄쥐의 폐장조직에서 분리된 한탄바이러스의 원형바이러스인 76/118균주를 성체 마우스의 뇌내로 접종하였을 때 마비증상을 일으키거나 바이러스 증식으로 인한 사망의 예는 볼 수 없었으나, 호왕균주를 접종한 성체 마우스는 바이러스 증식에 의한 마비증상과 접종 3주후 사망하는 병원성이 강한 바이러스인 것으로 나타났다. 또한 호왕균주의 항원성도 아주 높아 타혈청형 바이러스들인 서울바이러스 및 푸말라혈청형 바이러스들에 대하여 기존의 한탄혈청형 바이러스들 보다 훨씬 높은 교차항체역가를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 그러나 호왕균주의 유전자 염기서열에서 추정되는 아미노산과 생성되는 단백질은 76/118균주와 큰 차이를 볼 수 없었으며, 단백질의 2차원적 구조에서 약간의 차이를 볼 수 있었을 뿐이다. 바이러스 당단백질들의 경우에서도 당이 결합할 수 있는 부위가 76/118균주와 동일하게 잘 보존되어 있는 것을 볼 수 있었으며, 펩타이드를 사이에 황화결합에 의한 구조적 변이를 일으킬 수 있는 시스템인 아미노산의 함량도 거의 유사한 값을 나타내었다. 그럼에도 불구하고 호왕균주의 병원성이나 항원성이 높은 것은 생성되는 단백질의 3차원적 구조의 변화 따른 것으로 추정할 수 있겠다.

현재 신증후출혈열 예방백신의 종균으로 사용하고 있는 한국형출혈열환자의 혈액에서 분리된 84-105균주의 M, S 유전자 절편의 부분염기서열 분석결과 그 유전자 염기서열이 한탄바이러스 원형균주인 76-118과 약 1%정도의 차이를 나타낼 뿐이다 (personal communication). 따라서 새로이 분리된 병원성이 강하고 항원성이 높은 호왕균주를 사용하여 효능이 더욱 우수한 신증후출혈열 예방백신의 종균우로 사용할 수 있을 것이다.

결 론

1990년 중증의 임상증상을 나타내어 사망한 한국형출혈열 환자의 초기혈액으로부터 분리한 호왕균주는 기존의 한탄바이러스 보다 병원성이 강하며, 연쇄효소 중합방법을 사용하여 유전자

일부분을 증폭시킨 상보핵산을 몇가지 특이 제한효소로 절단하였을 때 기존의 한탄혈청형 바이러스와 다른 양상을 나타내었다. 호왕균주의 대, 중, 소 3 유전자 절편중 중간크기와 작은 크기의 2 유전자 절편의 염기배열을 분석하여, 이미 알려져 있는 한탄혈청형 바이러스들의 염기배열과의 차이를 분석하여 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 호왕균주의 M 유전자절편의 모두 3615개의 염기로 이루어져 있으며, 하나의 긴 open reading frame (ORF)을 가지는 것을 볼 수 있었다.
2. 한탄 76/118균주와는 약 93.5%의 상동률을 나타내고, 서울바이러스 80-39균주와는 69.6%의 상동률을, 푸말라바이러스 Hällnäs균주와는 44.1%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다.
3. 호왕균주 S segment는 한탄바이러스 76.118균주와 동일하게 모두 1696개의 염기로 이루어져 있으며, 두 균주 사이에 약 94%의 상동률을 나타내었다.
4. 추정되는 아미노산들의 협수도를 한탄바이러스 76-118균주와 비교하였을 때 거의 동일한 양상을 나타내었으나, 생성되는 단백질의 2차원적 구조를 비교하였을 때, 두 균주간에 약간의 차이가 있음을 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA, Dalrymple JM: Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 148: 1005-1011, 1983.
2. Chu YK, Rossi C, LeDuc JW, Lee HW, Schmaljohn CS, Dalrymple JM: Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology* 198: 196-204, 1994.
3. Xiao SY, LeDyc JW, Chu YK, Schmaljohn CS: Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology* 198: 205-217, 1994.
4. Lee HW, Lee PW, Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308, 1978.
5. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean

- hemorrhagic fever from wild urban rats. *J Infect Dis* 146: 638-644, 1982.
6. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, Van der Groen G, LeDuc JW: Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 38: 132-137, 1992.
 7. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morznov S, Rollin PE, Ksaizek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs A, Zaki S, Peters CJ: Genetic identification of a novel hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern United States. *Science* 262: 914-917, 1993.
 8. Rollin PE, Ksaizek TG, Elliott LH, Ravkov EV, Morzunov S, Livingstone W, Monroe M, Glass G, Ruo S, Khan A, Childs J, Nichol ST, Peters CJ: Isolation of Black Creek Canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. *J Med Virol* 46: 35-39, 1995.
 9. Lee HW, Van der Groen G: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 36: 62-103, 1989.
 10. Lee HW: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Infect Dis Suppl* 2: 864, 1989.
 11. Lee Ho W, Chu Yong K: Comparison of antigenicity of Hantaviruses by polymerase chain reaction for new vaccine candidate strain against hemorrhagic fever with renal syndrome and isolation of a new Howang virus. *Korea National Academy* 32: 121-133, 1993.
 12. Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM: Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology* 157: 31-39, 1987.
 13. Arikawa J, Connors LL, Wang M, Schmaljohn CS: Coding properties of the S and the M genome segments of Sapporo rat virus: comparison to other causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Virology* 176: 114-125, 1990.
 14. Giebel L, Stohwasser R, Zöller L, Bautz E, Darai G: Determination of coding capacity of the M genome segment of nephropathia epidemica virus strain Hällnäs B1 by molecular cloning and nucleotide sequence segment analysis. *Virology* 172: 498-505, 1989.
 15. Schmaljohn CS, Jennings C, Hay J, Dalrymple JM: Coding strategy of the S genome of Hantaan virus. *Virology* 155: 633-643, 1986.
 16. Stohwasser R, Giebel L, Zoeller L, Bautz E, Darai G: Molecular characterization of the RNA S segment of nephropathia epidemica virus strain Hällnäs B1. *Virology* 174: 79-86, 1990.
 17. Schmaljohn CS, Arikawa J, Hasty SE, Rasmussen L, Lee HW, Lee PW, Dalrymple JM: Conservation of antigenic properties and sequences encoding the envelope proteins of prototype Hantaan virus and two virus isoaltes from Korean hemorrhagic fever patients. *J Gen Virol* 69: 1949-1957, 1988.
 18. Antic D, Lim BU, Kang CY: Molecular characterization of the M genomic segment of the Seoul 80-39 virus: Nucleotide and amino acid sequence comparisons with other hantaviruses reveal the evolutionary pathway. *Virus Res* 19: 47-58, 1991.
 19. Xu X, Ruo SL, Tang Y, Fisher Hoch SP, McCormick JB: Molecular characterization and expression of glycoprotein gene of Hantavirus R22 strain isolated from *Rattus norvegicus* in China. *Virus Res* 21: 35-42, 1991.
 20. Spiropoulou CF, Morzunow S, Feldmann H, Sanchez A, Peters CJ, Nichol ST: Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 200: 715-723, 1994.