

## 대장균에서 한타바이러스 뉴클레오캡시드 유전자의 발현에 관한 연구

†노갑수·하석훈·김종완·홍선표·<sup>1</sup>김형배·<sup>2</sup>최차용  
제일제당 종합연구소, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학원, <sup>2</sup>서울대학교 공업화학과  
(접수 : 1998. 7. 29., 게재승인 : 1998. 10. 27.)

### Cloning and Expression of Nucleocapsid Genes of Hantaviruses in *Escherichia coli*

Kap Soo Noh<sup>†</sup>, Suk Hoon Ha, Jong Wan Kim, Sun Pyo Hong, Hyong Bai Kim<sup>1</sup>, and Cha Yong Choi<sup>2</sup>  
R&D Center of Cheiljedang, Corp., Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea.  
<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea.  
<sup>2</sup>Dept. of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.  
(Received : 1998. 7. 29., Accepted : 1998. 10. 27.)

Hantaviruses are rodent hosts-borne viruses belonging to the family *Bunyviridae*, and are etiologic agents for two acute diseases, i.e., Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) and Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS). There have been a lot of reports on prophylactic vaccines and diagnostics for the diseases, but most of viral antigens have been prepared by eukaryotic cell culture. Nucleocapsid proteins of Hantaviruses are known as the major viral antigens. Thereby, we prepared nucleocapsid genes of Hantaan virus and Seoul virus by RT-PCR and cloned into plasmid vectors, pET-3a and pKK223-3. Both genes were expressed in *Escherichia coli* with higher expression level of Seoul viral nucleocapsid protein compared to that of Hantaan in pET-3a. Hantaan viral gene was expressed much higher level in plasmid pET-3a than in pKK223-3. About 30% of expressed nucleocapsid protein was soluble and the rest was remained in insoluble fraction.

Key Words : Hantavirus, Nucleocapsid gene, *E. coli*, Expression

### 서 론

한타바이러스 속 (*Hantavirus* genus)의 바이러스들은 여러 종류의 설치류를 매개로 하여 유라시아 쪽에서는 신증후출혈열 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome)을 그리고 남북 아메리카 지역에서는 한타바이러스폐증후군(Hantavirus Pulmonary Syndrome) 이라는 2종의 심각한 질병을 유발한다. 세계적으로 각 지역 특성의 혈청형들(serotypes)이 보고된 바 있는데 현재 까지 적어도 약 12여종 이상이 알려져 있다 (1, 2) 그러나 해를 거듭함에 따라 새로운 혈청형들이 밝혀지고 있어 그 수가 증가하고 있는 추세이다. 신증후출혈열은 전세계적으로 매년 약 15만명 정도의 환자가 발생하여 병원에 입원하고 있으며 치사율은 지역에 따라 다르지만 약 3~10%에 이른다. 한타바이러스폐증후군은 1993년 4월 최초 발병의 발견 이후 1997년까지 남북 아메리카 지역에서 약 400 여명의 환자가 보고되어 이중 45%가

사망하였다

한타바이러스 속의 바이러스들은 *Bunyviridae* 과(family)에 속하며 직경이 약 80~100 nm의 원형 또는 타원형의 지질 단백질의 외막으로 둘러 싸여진 단일 가닥의 negative-sense RNA 바이러스이다. 분자량은 약 4,500 kDa 정도이며 RNA genome 은 3개의 segments(S, M, L)로 이루어져 있다(3). S segment 는 17 kb 크기이며 분자량 약 48 kDa 정도의 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein, N protein)을, M segment는 3.6 kb 크기로 분자량 64~70 kDa과 54 kDa의 당단백질(glycoprotein)인 G1, G2 외피단백질 (envelope protein)을 하나의 open reading frame으로 coding하고 있으며(4, 5). L segment 는 6.5 kb 크기로 분자량 246.5 kDa의 RNA-dependent RNA polymerase를 coding하고 있다. 뉴클레오캡시드 단백질은 RNA genome을 싸고 있는 것으로 알려져 있다(6)

백신 또는 진단체 개발을 위한 많은 연구가 있었지만 대부분 마우스의 뇌 또는 세포의 배양을 통해 얻은 바이러스 항원을 이용하였다(7-10). 일부 유전공학적 방법들을 통해 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질이나 G1, G2 단백질의 생산을 위한 시도가 있었으나 G1, G2 단백질에 대해서는 이렇다할 성과가 보고된 바 없으며, 다만 뉴클레오캡시드 단백질을 벡로로바이러스 발현시스템이나(11, 12) 대장균에서 발현에 성공하여 진단용

† Corresponding Author · R & D Center of Cheiljedang, Corp., 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Si, Kyonggi-Do 467-810, Korea  
Tel · 0336-639-4337, Fax · 0336-632-2781  
e-mail · ksnoh@cheiljedang.com

항원으로서의 유용성을 시사한 바 있다(13-16)

본 연구자들도 한타바이러스 속의 속하는 바이러스들 중에서 신증후출혈열의 주요 원인 바이러스로 알려진 한타바이러스(Hantaan virus)와 서울바이러스(Seoul virus)의 유전자 재조합 항원이 백신 또는 진단용 항원 물질로서의 유용성을 알아보기 위하여 대장균에서 뉴클레오캡시드 단백질을 생산코자 하였다. 벡터는 근래에 많이 사용되는 pET 맥터(17)와 *tac* 프로모터를 가진 pKK223-3(18)를 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 박테리아, 바이러스, 플라스미드, nucleotide oligomers

유전자 조작을 위한 숙주 대장균으로는 HB101을 사용하였고 클로닝된 유전자의 발현용 숙주 대장균으로는 BL21(DE3) [F<sup>-</sup>, *ompT(lon)*, *hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*: an *E. coli* B strain) with DE3, a λ prophage carrying the T7 RNA polymerase gene(17), JM105 [*endA1*, *thi*, *rpsL*, *sbcb15*, *hsdR4(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>)*, Δ(*lac-proAB*)/F', *traD36*, *lacI<sup>q</sup>ΔM15*], 또는 HB101 [F<sup>-</sup>, Δ(*gpt-proA*)62, *leuB6*, *supE44*, *ara-14*, *galK2*, *lacY1*, Δ(*mcrC-mrr*), *rpsL20(Str<sup>r</sup>)*, *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*]을 사용하였다. 뉴클레오캡시드 유전자 합성을 위해서는 ATCC (Rockville, Maryland, USA)로부터 분양 받은 한타바이러스 원형 76-118과 중국의 약품생물제품검정연구소 (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products NICPBP)로부터 얻은 서울바이러스 R22(19)를 사용하였다.

바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자를 *E. coli* 내에서 발현하기 위해서는 플라스미드 pET-3a(17)와 pKK223-3(18)를 사용하였다. pET-3a는 Stratagene사 (Cambridge, United Kingdom)로부터 구입하였으며 pKK223-3은 Pharmacia LKB Biotech사 (Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. 바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자 증폭을 위해 사용된 프라이머들은 Table 1과 같으며 한국생공에 합성을 의뢰하여 사용하였다.

Table 1. Primers used for PCR amplification of nucleocapsid gene.

NP 1 (17MER): 5'-TAGTAGTAGACTCCCTA-3'
NP 2 (23MER): 5'-CCAGATCTATGGCAACTATGGAG-3'
<i>Bgl</i> II
NP 3 (22MER): 5'-GGAATTCCTTAGAGTTTCAAAGG-3'
<i>Eco</i> I
NP 4 (23MER): 5'-CCGAATTCATGGCAACTATGGAG-3'
<i>Eco</i> R I
NP 5 (23MER): 5'-GCGTCGACTTAGAGTTTCAAAGG-3'
<i>Sal</i> I

### 배지, 효소 및 기타 시약

플라스미드 벡터를 갖지 않는 대장균의 배양을 위해서는 LG broth (NaCl 10 g, tryptone 10 g, yeast extract 5 g, glucose 2 g /L, pH 7.0) 또는 LG agar (LG broth, agar 2%)를 사용하였으며 플라스미드를 가지는 대장균의 배양을 위해서는

LG-ampicillin broth (LG broth + ampicillin 50 mg/L) 또는 LG-ampicillin agar (LG agar + ampicillin 50 mg/L)를 사용하였다. 대장균에 플라스미드를 형질전환(transformation) 시킬 때는 전기장충격법(Electroporation or Electro-transformation)을 이용하였는데, 이때 형질전환된 대장균의 활성화를 위해서는 SOC 배지(tryptone 20%, yeast extract 5%, glucose 4%, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, pH 7.0)를 사용하였다.

각종 유전자 조작에 사용된 제한효소(restriction endonuclease), 접합효소(T4 DNA ligase), 등은 Boehringer Mannheim (Germany) 또는 New England Biolabs사(Beverly, Massachusetts, USA)의 제품을 사용하였으며, Reverse transcription과 PCR(Polymerase Chain Reaction)은 Perkin-Elmer Cetus사 (Norwalk, Connecticut, USA)의 GeneAmp RNA PCR kit (Part No. N801-0060)를 사용하였다. Western blot을 위한 1차 항체로는 자체에서 제작한 hybridoma 세포에서 생산된 Hantaan virus의 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일클 항체 ht90-40을 사용하였으며 2차 항체로는 HRP(Horse radish peroxidase)가 conjugation된 goat anti-mouse IgG를 Accurate Chemicals and Scientific사 (Westbury, New York, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 유전자 조작, SDS-PAGE 및 western blot

바이러스 RNA의 분리는 Burleson 등의 방법(20)을 따랐으며, 분리한 바이러스 RNA로부터 cDNA의 합성을 위한 역전사(reverse transcription)와 뉴클레오캡시드 유전자의 증폭을 위한 PCR은 Perkin-Elmer Cetus사 (Norwalk, Connecticut, USA)의 GeneAmp RNA PCR kit와 DNA Thermal Cycler 480을 사용하여 수행하였다 여기서 사용되는 역전사 효소(reverse transcriptase)는 Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) 유래의 역전사 효소이다. 방법은 PCR 키트에 서술한대로 수행하였다

플라스미드의 대량 분리는 Sambrook 등의 방법(21)에 따라 정제하여 사용하였으며, DNA의 절단은 New England Biolabs사 또는 Boehringer Mannheim사의 제한효소와 같이 들어온 10x reaction 버퍼를 사용하였으며 37°C에서 1~2 시간 반응시킨 후 EDTA를 5 mM 되게 첨가하여 70°C에서 10 분간 불활성화시켰다 이것을 phenol/chloroform 처리를 하거나 아가로스 상에서 전기영동하여 원하는 DNA 절편만을 Gene Clean II kit (Bio 101 Inc.)를 사용하여 회수하였다. DNA의 절합은 벡터 DNA와 삽입하고자 하는 DNA 절편을 molecule 비로 1:4 정도로 섞어 sticky end ligation은 37°C에서 2시간, blunt end ligation은 22°C에서 16 시간 반응시켰다

대장균의 형질전환은 전기장충격법을 사용하였다. 전기장충격법에 사용한 기기는 Bio-Rad사에서 제작한 GenePulser를 사용하였으며 방법은 매뉴얼에 기술된대로 수행하였다

재조합 플라스미드의 스크리닝은 단일클로니의 크래킹(cranking) 방법을 사용하였다. 크래킹 버퍼(0.05 M Tris(pH6.8), 1% SDS, 2 mM EDTA, 0.4 M sucrose, 0.01% bromophenol blue) 80 μl에 한천 평판배지로부터 1 루프의 균체를 넣고 vortex mixer로 혼합하여 마이크로 원심분리기로 12,000 rpm에서 15분 원심분리하여 상등액을 취해 아가로스 겔 상에서 전기영동으로 플라스미드를 확인하였다. 크래킹으로 확인된 클론들

은 Sambrook 등의 방법(22)에 따라 플라스미드를 분리, 절단 및 전기영동을 통해 2차 확인하였다.

SDS-PAGE는 Novex사의 (San Diego, California, USA) Xcell II Mini-Cell과 precast gel을 사용하였는데 겔 type은 Laemmli Tris-Glycine type gel로서 acrylamide 조성은 8~16% gradient 또는 12%인 것을 사용하였으며 denaturing, reducing 조건에서 전기영동을 수행하였다. Western blot은 Novex사의 XCell II Mini-Cell과 Blot module을 이용하여 Tris-Glycine transfer 비퍼 (12 mM Tris, 96 mM glycine, 10 % methanol, pH 8.3)를 사용하여 수행하였으며 방법은 Sambrook 등의 방법(23)을 따랐다.

**결과 및 고찰**

**뉴클레오캡시드 유전자 (nucleocapsid gene)의 합성**

바이러스의 RNA를 template로 하고 random hexamer를 primer로 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 다시 이 cDNA를 template로하여 pET-3a에 클로닝하기 위한 뉴클레오캡시드 유전자를 합성하였다. 먼저 Table 1의 프라이머 NP1과 NP3를 사용하여 DNA를 1차 합성하고 이 중 다시 5 $\mu$ 를 취해 NP2와 NP3를 프라이머로 사용하여 DNA를 2차 증폭하였다 이 때 사용한 프라이머 NP2와 NP3의 5'-말단에는 pET-3a에 클로닝하기 위한 제한 효소 *Bgl* II (AGATCT)와 *Eco*R I (GAATTC)의 인식 부위를 각각 포함시켰다. pKK223-3에 클로닝하기 위한 뉴클레오캡시드 유전자의 합성은 앞에서 NP1과 NP3를 사용하여 1차 증폭된 DNA를 template로 사용하여 프라이머 NP4와 NP5를 사용하여 2차 증폭하였다. NP4와 NP5에는 pKK223-3에 클로닝하기 위한 제한효소 *Eco*R I과 *Sal* I (GTTCGAC)의 인식 부위를 각각 포함시켰다. PCR을 통해 증폭된 DNA의 전기영동 결과를 Figure 1에 나타내었다. 1.3 kb 크기의 증폭된 뉴클레오캡시드 유전자를 확인할 수 있었다

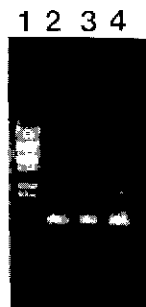


Figure 1. Electropherogram of PCR product of Hantaan viral nucleocapsid gene.

lane 1; molecular size marker ( $\lambda$  DNA cleaved with *Bst*E II), lane 2-4, PCR-amplified nucleocapsid gene

**제조합 플라스미드의 제작**

PCR을 통해 합성된 DNA는 전기영동한 후 Gene Clean kit를 사용하여 1.3 kb 크기의 뉴클레오캡시드 유전자를 회수하였다 pET-3a에 클로닝하기 위해서는 회수된 DNA는 *Bgl* II와 *Eco*R I으로 이중절단한 후 *Bam*H I과 *Eco*R I으로 이중절단된 pET-3a와 상호접합 (ligation)시켜 HB101에 형질전환시켰다.

pKK223-3에 클로닝하기 위해서는 아가로스 겔로부터 회수된 DNA 절편을 먼저 klenow enzyme으로 처리하여 양 말단을 확실하게 blunt-ends로 만든 후 *Eco*R I으로 처리하여 한쪽을 sticky end로 만들고 pKK223-3은 *Eco*R I과 *Sma* I으로 이중절단하여 상호 접합한 후 JM105에 형질전환시켰다. 당초에는 *Eco*R I과 *Sal* I sites에 클로닝할 목적으로 DNA 합성때 한쪽 말단에 *Sal* I 부위를 포함시켰으나 pKK223-3의 multiple cloning site 이외의 다른 부분에도 또 1개의 *Sal* I 부위가 존재함을 발견하고 *Sal* I 대신 *Sma* I 부위를 사용하여 한쪽은 blunt end ligation을 시켰다

여기서 제작된 유전자 제조합 플라스미드를 pET-NP와 pKK-NP로 각각 명명하였으며 제조합 벡터들의 구조를 Figure 2에 나타내었다. 제작된 pET-NP와 pKK-NP의 제한효소와 전기영동을 통한 분석 결과를 Figure 3과 Figure 4에 각각 나타내었다. pET-3a와 pET-NP를 각각 *Bgl* II와 *Eco*R I으로 2중절단하였을 때 pET-3a는 644 bp의 DNA 절편이 생기나 pET-NP의 경우는 뉴클레오캡시드 유전자가 올바르게 클로닝된 경우 1434 bp 의 DNA 절편이 생성된다. Figure 4의 lane 4에서 보는 바와 같이 1.4 kb 위치에 DNA 절편을 관찰할 수 있다.

제조합 플라스미드의 pKK-NP의 확인을 위해서는 pKK223-3과 pKK-NP를 각각 *Sal* I으로 절단하여 전기영동을 통하여 DNA 절편의 크기를 확인하였다 Figure 4에서 보는 바와 같이 pKK223-3은 532 bp의 절편을 pKK-NP는 뉴클레오캡시드 유전자가 바르게 클로닝된 경우 1830 bp 의 절편이 생성되어야 하는데 lane 4에서 보는 바와 같이 약 1.8 kb의 위치에서 DNA 절편을 관찰할 수 있다.

pET-3a에는 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)에서 분리된 원형 Hantaan virus 76-118의 뉴클레오캡시드 유전자 이외에 집쥐 (*Rattus norvegicus*)에서 분리된 Seoul virus의 뉴클레오캡시드 유전자도 한탄바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자를 클로

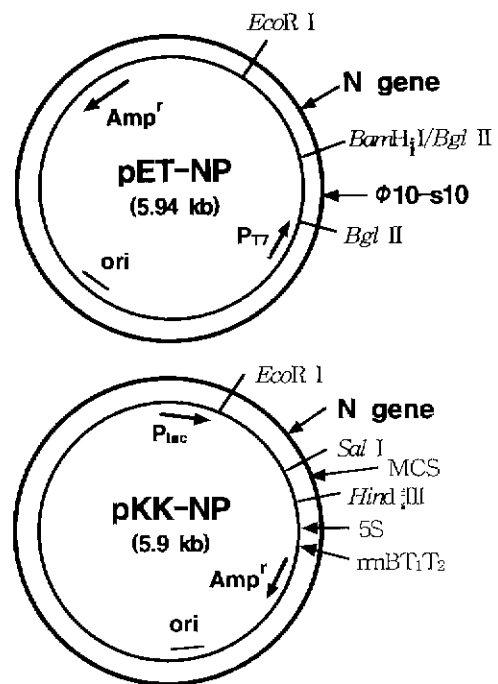


Figure 2. Structures of recombinant plasmids pET-NP and pKK-NP.

닝한 동일한 과정을 거쳐 재조합 플라스미드를 제작하여 pET-sNP로 명명하였다. 여기서 제작된 뉴클레오캡시드 유전자의 발현을 위한 재조합 플라스미드들을 Table 2에 정리하였다.

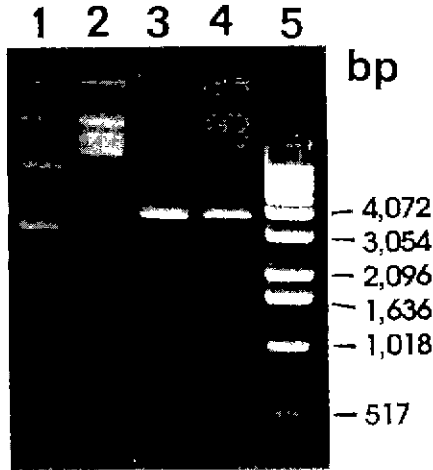


Figure 3. Electrophorogram of recombinant plasmid pET-NP. lane 1; intact pET-3a, lane 2; intact pET-NP, lane 3: pET-3a cleaved with *Bgl* II and *EcoR* I, lane 4: pET-NP cleaved with *Bgl* II and *EcoR* I, lane 5; molecular size marker (1 kb ladder)

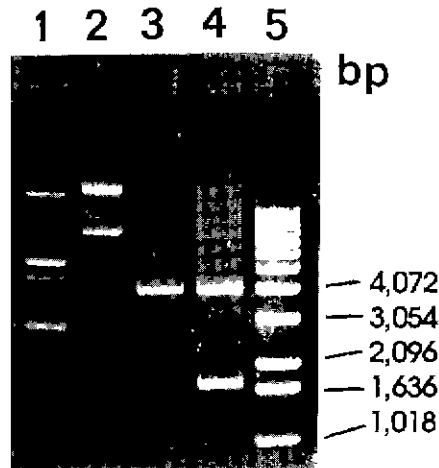


Figure 4. Electrophorogram of recombinant plasmid pKK-NP. lane 1; intact pKK223-3, lane 2; intact pKK-NP, lane 3; pKK223-3 cleaved with *Sal* I, lane 4: pET-NP cleaved with *Sal* I, lane 5; molecular size marker (1 kb ladder)

Table 2. Constructed expression vectors and their products.

Recombinants	Gene source	Vectors used	Expressed NP	
			Amino acid	M. W
pET-NP	Hantaan 76-118 from <i>Apodemus agrarius</i>	pET-3a	443	49,500
pET-sNP	Seoul from <i>Rattus norvegicus</i>	pET-3a	413	49,500
pKK-NP	Hantaan 76-118 from <i>Apodemus agrarius</i>	pKK223-3	429	48,000

여기서 보면 pET-3a 벡터를 사용한 경우가 pKK223-3을 사용한 경우보다 이론적으로 분자량이 1500 정도 높게 나타나는 데 이것은 pET-3a에서 발현된 뉴클레오캡시드 단백질은 벡터 자체에서 bacteriophage T7의  $\Phi 10$  프로모터와 연결된 s-10 leader peptide와 융합된 형태로 발현되기 때문이다.

뉴클레오캡시드 단백질의 발현 및 분석

재조합 균주의 발현을 위한 배양은 250 rpm과 37°C로 세팅된 rotary shaker에서 수행하였으며 배지는 LG-ampicillin broth를 사용하였다. 배양 용기는 baffles이 달린 플라스크를 사용하였다. 배양액의 흡광도 ( $A_{600}$ )가 0.5~0.8에 도달했을 때 IPTG를 0.5 mM되게 첨가하여 4~8 시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 0.8% NaCl 용액으로 1회 세척하였다. 회수된 균체를 배양액의 1/20 부피의 50 mM Tris(pH 8.0)에 현탁하여 초음파기(Fisher Dismembrator Model 300)를 사용하여 균체를 파쇄하였는데 파쇄의 정도는 Bradford assay(24) 방법을 써서 파쇄액의 단백질 농도가 더 이상 증가하지 않을 때까지 수행하였다. 파쇄된 용액을 Beckman의 초고속 원심분리기 L7 (Rotar type 16)를 사용하여 8,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 취하여 분석하였다.

상등액을 SDS-PAGE를 수행하고 이것을 western blot으로 nitrocellulose membrane에 이동시켜 한탄바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체와 반응시켜 발색 반응을 통하여 확인하였다. SDS-PAGE 만으로도 음성대조군(negative control)과 비교하여 확인할 수 있겠지만 정확을 기하기 위해 western blot을 수행하였다. Figure 5에 플라스미드 pET-NP, pET-sNP와 pKK-NP를 포함한 대장균 BL21(DE3)에서 발현된 뉴클레오캡시드 단백질의 western blot의 결과를 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 분자량 50,000 위치에서 확실한 뉴클레오캡시드 단백질의 bands를 관찰할 수 있다. Lane 3(pET-NP)와 lane 4(pET-sNP)의 뉴클레오캡시드 단백질의

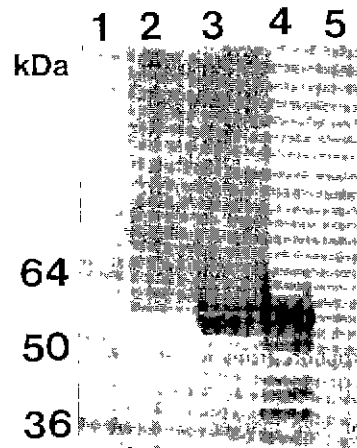


Figure 5. Western blot analyses of Hantaan and Seoul viral N proteins expressed in *E. coli*. Bacterial whole lysates were loaded on SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membrane. As primary antibodies, anti-Hantaan viral N protein mAbs were used. lane 1: size marker, lane 2: BL21(pET-3a), lane 3: BL21(pET-NP), lane 4: BL21(pET-sNP), lane 5: BL21(pKK-NP)

위치가 lane 5(pKK-NP)의 뉴클레오캡시드 단백질 위치 보다 다소 위에 위치함을 확인할 수 있다 이것은 Table 2에서도 설명했듯이 pET-3a를 발현 벡터로 사용하는 경우 뉴클레오캡시드 단백질이 원래보다 14개의 아미노산이 더 많은 용합 형태로 발현하는데 기인하는 것으로 앞에서 이론적으로 분석한 분자량 1,500의 차이와 일치한다. 또한 동일한 발현 벡터(pET-3a)를 사용했음에도 한탄바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(lane 3) 보다는 서울바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질(lane 4)의 발현량이 많음을 관찰할 수 있는데 이것은 한탄바이러스와 서울바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질 유전자의 염기서열(71% 유사성)과 단백질의

아미노산 서열 (82% 유사성)의 차이에 기인하는 특성의 차이로 생각된다 즉 염기서열상의 차이로 인한 mRNA의 안정성의 차이나 translation 효율상의 차이를 생각해 볼 수 있으며 다른 요인으로는 생산된 단백질의 아미노산 서열상의 차이로 인하여 세포질 내에서의 분해 속도가 달라질 수 있으며 이로 인하여 세포질 내에 축적된 뉴클레오캡시드 단백질의 양이 달라질 수 있다.

또한 결과로부터 동일한 한탄바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자를 사용한 경우는 pET-NP에서 발현되는 뉴클레오캡시드 단백질 양이 pKK-NP에서 발현되는 뉴클레오캡시드 단백질의 양보다 월등히 많음을 알 수 있었다. 이 결과는 본 실험자들이 예상했던 것과는 매우 상반된 결과였다. 왜냐하면 pKK-NP의 경우는 대장균 발현 시스템에서는 매우 강력한 것으로 알려져 있는 *tac* 프로모터 (*tac* promoter)에 의해 발현이 조절되기 때문이었다. pKK-NP에 의한 뉴클레오캡시드 단백질의 발현량이 작은 원인이 숙주 대장균의 차이에 있을 수도 있다고 판단하여 JM105 외에도 BL21(DE3)와 HB101에 pKK-NP를 형질전환하여 뉴클레오캡시드 단백질의 발현량을 비교하여 보았다. Western blot을 통한 분석 결과를 Figure 6에 나타내었다. pKK-NP의 경우 숙주 대장균에 따라서 발현량에 다소의 차이

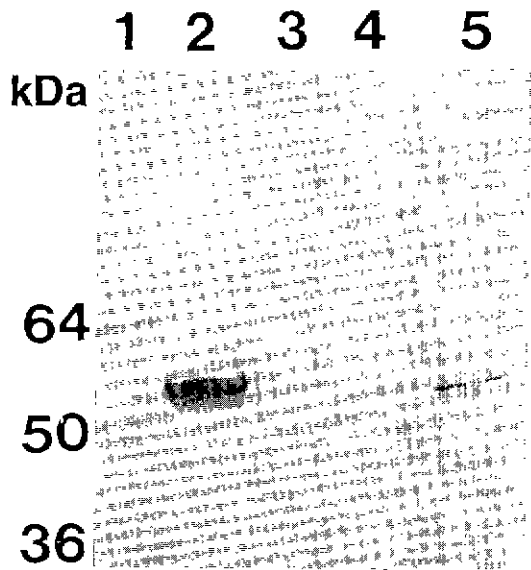


Figure 6. Western blot analyses of N proteins expressed in different *E. coli* strains harboring pKK-NP. lane 1; size marker. lane 2. BL21(pET-NP), lane 3; HB101(pKK-NP), lane 4. JM105(pKK-NP), lane 5. BL21(pKK-NP)

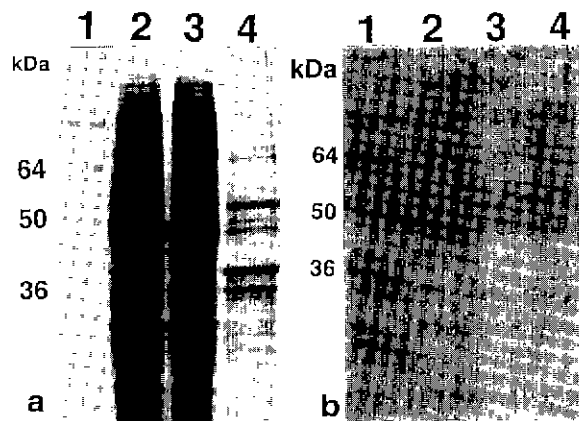


Figure 7 Confirmation of soluble and insoluble forms of N protein expressed in *E. coli*.

lane 1; size marker, lane 2; whole cell lysate, lane 3; supernatant taken after centrifugation of whole cell lysate, lane 4. sediment after centrifugation of whole cell lysate

는 있으나 여전히 pET-NP에 의한 발현량에는 훨씬 못 미쳤다. pKK-NP의 숙주 대장균에 따른 뉴클레오캡시드 단백질의 발현량을 보면 BL21에서 가장 우수했고 다음이 HB101, JM105 순이었다. BL21에서 발현되는 뉴클레오캡시드 단백질 양이 JM105나 HB101에 비해서는 많은 이유는 BL21이 다른 숙주 균주들에 비해 영양 요구성이 없는 야생주(wild-type)에 가까워 생장이 우수하고 *lon* protease와 *ompT* protease를 생산하지 못하는 균주이기 때문에 생산된 뉴클레오캡시드 단백질이 균체 내에서 보다 안정하게 유지될 수 있음에 기인할 것으로 추측되었다.

이췌든, pET-NP와 pKK-NP의 뉴클레오캡시드 단백질의 발현량의 차이는 숙주 대장균의 차이로는 설명이 되지 않았으므로 다른데서 그 원인을 찾을 수밖에 없다. 추측할 수 있는 가능성으로는 transcription의 효율성, translation의 효율성, 또는 생산된 단백질의 세포질 내에서의 안정성이나 생산된 뉴클레오캡시드 단백질의 균체에 대한 cytotoxic한 영향을 들 수 있겠다. pET-NP의 경우는 클로닝된 뉴클레오캡시드 유전자 앞쪽에 bacteriophage T7 유래의  $\phi 10$  프로모터와 여기에 연속하여 s-10 signal sequence를 포함하고 있으므로 이것이 뉴클레오캡시드 유전자의 transcription의 효율이나 또는 생성된 mRNA로부터의 translation 효율성을 높여 줄 수도 있을 것이다. 실제 여기서 생성되는 mRNA의 구조를 보면 뉴클레오캡시드 유전자의 *Bam*H I cloning site 앞쪽 처음 21개 nucleotides가 8개 base pairs의 stem-and-loop 구조를 가지는데 이 구조가 확실히 밝혀지진 않았지만 mRNA의 안정성과 효율적인 transcription에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. pET-NP에 의해 생산된 뉴클레오캡시드 단백질은 뉴클레오캡시드 단백질의 N-terminal 앞쪽에 s-10 signal peptide를 포함하여 14개의 아미노산을 더 갖는 융합단백질의 형태로 발현된다. 이렇게 융합 형태로 생산된 단백질은 숙주 세포질 내에서 융합되지 않은 단백질보다는 안정한 형태로 존재하여 세포질 내에서 pKK-NP에 의해 생산된 뉴클레오캡시드 단백질보다 분해속도가 더 느릴 수도 있을 것이다. 아니면 융합된 형태의 뉴클레오캡시드 단백질

이 원래의 뉴클레오캡시드 단백질보다 숙주세포에 cytotoxic한 영향을 덜 줄 수도 있을 것이다.

이러한 가능성에 대한 간접적인 시험으로 플라스미드 안정성을 조사하여 보았는데 inducer인 IPTG가 첨가된 배지 중에서 pKK-NP를 포함하는 대장균은 배양 10세대 이후에는 이미 플라스미드를 모두 소실하였고, 반면 pET-NP를 포함하는 대장균은 배양 10세대 이후에도 약 70% 정도가 플라스미드를 가지고 있었다. 그러나 2종의 균주 모두 inducer가 첨가되지 않은 배지 내에서는 거의 100% 에 가까운 플라스미드의 안정성을 보였다. 이 사실은 뉴클레오캡시드 단백질의 생산이 플라스미드의 안정성에 직접적인 영향을 미치며, 또한 여기서 생산된 2종의 뉴클레오캡시드 단백질이 정도의 차이는 있지만 숙주세포에 toxic한 영향을 미치고 있다는 간접적인 증거라고 할 수 있다.

BL21(pET-NP)에서 발현되는 뉴클레오캡시드 단백질의 세포 내에 존재하는 형태, 즉 soluble form의 뉴클레오캡시드 단백질과 insoluble form으로 존재하는 뉴클레오캡시드 단백질의 양을 조사해 보았다. 방법은 Sambrook 등의 방법(25)을 사용하였다. Figure 7에 그 결과를 나타내었는데 약 70% 이상의 뉴클레오캡시드 단백질이 insoluble form으로 존재함을 알 수 있었다.

## 요 약

한타바이러스 속에 속하는 바이러스들은 신증후출혈열과 한타바이러스증후군이라는 2종의 급속한 질병을 유발하는 원인으로 알려져 있다. 지금까지 이러한 질병에 대한 백신과 진단제 개발을 위한 바이러스 항원은 주로 세포배양을 통하여 조달하였으나 본 연구자들은 한타바이러스의 주요 항원으로 알려져 있는 뉴클레오캡시드 단백질을 대장균에서 대량 생산코자 한타바이러스와 서울바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자를 RT-PCR을 통해 합성하여 2종의 플라스미드 벡터 pET-3a와 pKK223-3에 클로닝하였다. 대장균에서의 발현을 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 단일군 항체를 사용한 western blot을 통하여 관찰한 결과 모두 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 pKK223-3에서 보다는 pET-3a에서 월등히 발현량이 많은 것을 알 수 있었다. 또한 동일한 pET-3a를 사용하였을 때는 한타바이러스 보다는 서울바이러스의 뉴클레오캡시드 유전자의 발현량이 많았으며 한타바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질은 30% 정도가 soluble form으로 존재하였고 70% 정도는 insoluble form으로 존재하였다.

## 참 고 문 헌

- Hjelle, B., S. A. Jenison, D. E. Goade, W. B. Green, R. M. Feddersen, and A. A. Scott (1995), Hantaviruses: Clinical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 32, 469-508.
- 노갑수 (1997), 유행성출혈열과 한타바이러스 (Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantaviruses), *미생물과 산업*, 23, 10-17.
- Schmaljohn, C. S. and J. M. Dalrymple, (1983), Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae, *Virology*, 131, 482-491.
- Schmaljohn, C. S., G. B. Jennings, J. Hay, and J. M. Dalrymple (1986), Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus, *Virology*, 155, 633-643.
- Schmaljohn, C. S., A. L. Schmaljohn, and J. M. Dalrymple (1987), Hantaan virus M RNA coding strategy, nucleotide sequence, and gene order, *Virology*, 157, 31-39.
- Schmaljohn, C. S. (1990), Nucleotide sequence of the L segment of hantaan virus, *Nucleic Acid Res.*, 18, 6722-6728.
- Schmaljohn, C. S., K. Sugiyama, A. L. Schmaljohn, and D. H. L. Bishop (1988), Baculovirus expression of the small genome segment of Hantaan virus and potential use of the expressed nucleocapsid protein as a diagnostic antigen, *J. Gen. Virol.*, 69, 777-186.
- Lee, H., C. Ahn, L. Baek, T. Soe, and S. Park (1990), Field trial of an inactivated vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome in human, *Arch. Virol. (Suppl. I)*, 35-47.
- Shin, Y. C., Y. O. Baik, S. P. Hong, K. S. Noh, S. H. Lee, S. O. Kim, W. D. Yoo, and P. W. Lee (1995), Development of inactivated vaccine against HFRS using a variant of prototype Hantaan virus strain, *J. Korean Soc. Microbiol.*, 30, 359-365.
- Song, G., Y. C. Huang, C. S. Hang, F. Y. Hao, D. X. Li, X. L. Zheng, W. M. Liu, S. L. Li, Z. W. Huo, L. J. Hui, and Q. F. Zhang (1992), Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), *Vaccine*, 10, 214-216.
- Yamanishi, K., O. Tanushita, M. Tamura, H. Asada, K. Kondo, M. Takagi, I. Yoshida, T. Konobe, and K. Fukai (1988), Development of inactivated vaccine against virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome, *Vaccine*, 6, 278-282.
- Vapalathi, O., A. Lundkvist, K. M. Hanimari, K. Pauku, I. Julkune, H. Lankinen, and A. Vather (1996), Antigenic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells, *J. Clin. Microbiol.*, 34, 119-125.
- Wang, M., C. Rossi, and C. S. Schmaljohn (1993), Expression of non-conserved regions of the S genome segments of three hantaviruses: evaluation of the expressed polypeptides for diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome, *J. Gen. Virol.*, 74, 115-1124.
- Gott, P., L. Zoller, R. Stohwasser, E. K. F. Bautz, and G. Darai (1991), Antigenicity of hantavirus nucleocapsid protein expressed in *E. coli*, *Virus Res.*, 19, 1-16.
- Zoller, L. G., S. Yang, and P. Gott (1993), A novel  $\mu$ -capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1194-1199.
- Zoller, L. G., S. Yang, and P. Gott (1993), Use of rec-

- ombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and nephropathia epidemica serotypes of hantaviruses as immunodiagnostic antigens, *J. Med. Virol.* **39**, 200-207.
17. Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff (1990), Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Meth. Enzymol.*, **185**, 60-89.
  18. Brosius, J. and A. Holy (1984), Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6929-6933.
  19. Song, G., C. S. Hang, H. X. Liao, J. L. Fu, G. Z. Gao, H. L. Qu, and Q. F. Zhang (1984), Antigenic differences between viral strains causing classical and mild types of epidemic haemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J. Infect. Dis.*, **150**, 889-894
  20. Burleson, F. G., T. M. Chambers, and D. L. Wiedrauk (1992), *Virology: A Laboratory Manual*, pp. 186-194, Academic Press, San Diego.
  21. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed., pp. 1.40-1.52, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  22. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed., pp. 1.53-1.73, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed., pp. 18.60-18.75, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
  24. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
  25. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning*, 2nd ed., pp. 7.36-7.41, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.