

한국에서 분리된 전염성 조혈괴저 바이러스의 non-virion (NV) 단백질의 유전자 클로닝 및 바이러스 증식에서의 역할

문창훈 · 조희자 · 윤원준 · 박정재 · 박정민 · 김현주 · 도정완¹ · 이주양 · 임채렬 ·
이영애 · 박명애¹ · 손상규¹ · 박정우*
울산대학교 생명과학부, ¹국립수산진흥원 병리과

한국에서 분리된 전염성 조혈괴저바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)인 IHNV-PRT의 non-virion (NV) 단백질을 암호화하고 있는 cDNA를 클로닝하여 이들의 염기서열을 분석하였다. NV는 336 bp 크기의 open reading frame을 포함하였으며 이로부터 111개의 아미노산으로 구성된 13.2 kDa의 분자량을 가진 단백질이 합성될 수 있다. IHNV-PRT의 NV의 아미노산 서열을 외국에서 분리된 IHNV들과 비교 분석한 결과 90-95%의 상동성을 보였다. 이러한 사실은 IHNV의 NV 단백질 유전자들은 IHNV의 strain에 관계없이 매우 보존되어 있음을 나타내준다. Northern blotting을 사용하여 NV의 발현을 측정한 결과 감염 후 20 시간부터 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. NV가 바이러스의 증식에 필요한지의 여부를 확인하기 위하여 바이러스 유전자의 antisense DNA를 사용하여 바이러스 증식 억제에 관한 실험을 수행하였다. Glycoprotein (G)의 antisense DNA를 처리한 경우 바이러스의 증식이 거의 억제된 반면 NV에 대한 antisense DNA를 처리한 경우 바이러스 증식에 거의 변화가 없었다. 이로부터 배양중인 세포에 있어서 NV는 증식에 필수적이지 않은 것으로 판단된다.

Key words □ antisense DNA, infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), NV gene

서 론

전염성 조혈괴저바이러스 (IHNV)는 연어 및 송어의 치어에 질병을 일으키는 rhabdovirus이다 이 virus는 1960년대에 처음으로 분리되어(23) IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus)로 명명된(2) 이래 북미 서부지역에 널리 분포하여 매년 연어, 송어 등의 양식에 큰 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(17). IHNV는 다섯 종류의 구조단백질 즉, polymerase (L), surface glycoprotein (G), nucleocapsid (N), 그리고 matrix protein (M1과 M2)으로 이루어져 있으며(11,12) 핵산으로 단일가닥의 (-)RNA를 지니고 있다(14). IHNV의 genomic RNA(3,19)와 mRNA(8)를 분석한 결과 다섯 종류의 구조 단백질 이외에 비구조 단백질인 non-virion (NV)을 암호화하는 유전자가 존재함이 확인되었으며 유전자의 배열이 3'-N-M1-M2-G-NV-L-5'임이 밝혀졌다.

IHNV의 증식에 있어서 NV의 역할에 대하여는 아직 밝혀진 바가 없다. Nichol 등(15)은 12 종류의 IHNV strain들을 대상으로 NV 유전자의 염기서열을 비교 분석한 결과 변이가 거의 없이 잘 보존되어 있음을 확인하였다. 이로부터 바이러스의 증식에 있어서 NV가 중요한 역할을 할 것이라고 추측을 하였다 그러나 어류의 rhabdovirus들 중 hiram rhabdovirus, IHNV, viral haemorrhagic septicemia 등의 바이러스에는 NV가 존재하는 반면 vesiculovirus-like fish rhabdovirus에는 NV가 존재하지 않음

이 확인되어(9), IHNV가 포함되어 있는 어류 rhabdovirus의 증식에 있어서는 NV가 필요하지 않음 가능성이 높음을 암시하였다. 그리고 Johnson등(7)은 어류 rhabdovirus의 일종인 snakehead rhabdovirus의 NV 유전자를 knock out 시킨 바이러스를 제조한 후 세포에 접종한 결과 바이러스 증식에 변화가 없음을 확인하여 배양중인 세포에서는 NV가 필요하지 않음을 확인하였다.

한국의 경우, IHNV 등의 바이러스가 물고기 양식에 큰 피해를 입히고 있는 미국, 일본 등으로부터 연어의 알을 여러 번 수입하였고, 동해안으로 회귀하여 돌아오는 연어가 북태평양에서 미국 및 일본의 연어와 섞여 지내다 온다는 사실로 볼 때 양식 연어에 이들 바이러스가 존재할 가능성은 매우 높다. 실제로 1991년에 한국에서 양식되고 있는 무지개송어에서 IHNV가 분리되었는데, 외국에서 분리된 IHNV strain들과 다른 혈청형을 가지고 있음이 확인되었다(16).

본 연구에서는 한국에서 분리된 IHNV strain인 IHNV-PRT의 특성을 보다 명확히 규명하기 위하여 IHNV-PRT의 NV의 cDNA를 클로닝하여 유전자의 염기 서열을 분석하였으며, IHNV의 증식에 있어서 NV가 필요한지의 여부를 확인하기 위하여 바이러스 감염 후 발현양상 및 antisense oligonucleotide를 사용하여 발현을 억제 시킨 후 IHNV의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 바이러스

IHNV의 숙주세포로서 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryos)

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 052-259-2356 Fax: 052-259-1694
E-mail; jwpark@uou.ulsan.ac.kr

(10) cell line을 사용하였다 세포는 fetal bovine serum이 10% 첨가된 minimum essential medium (MEM)을 사용하여 18°C에서 배양하였다. IHNV를 접종한 세포의 경우 16°C에서 배양하였다. 실험에 사용한 바이러스는 한국의 양식 어류에서 분리된 IHNV 중 대부분을 차지하며 또한 한국에만 존재하는 것으로 확인된 type (IHNV-PRT) (16)을 선택하여 실험하였다

Polymerase Chain Reaction (PCR) 클로닝 및 Probe의 준비

cDNA library로부터 IHNV의 유전자를 지니는 clone들을 screening하고, 또한 Northern blotting 실험에 사용하기 위하여 PCR을 수행함으로써 probe를 제조하였다. IHNV의 NV의 PCR primer는 이미 보고(13)된 바 있는 IHNV-WRAC의 염기서열을 참고하여 제작하였다. 본 연구에 사용한 PCR primer는 다음과 같다; sense, 5'-CGAATTCTCTTTTGTGACGG-3'; antisense, 5'-CGAATTCTATCTGGGATAAGC-3'. CHSE-214 세포에 IHNV-PRT를 감염시키고 25 시간 지난 후에 guanidium thiocyanate-acid phenol-chloroform 법(4)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 1 µg을 M-MLV reverse transcriptase (GibcoBRL, USA)를 사용하여 cDNA를 제조하였다. 제조한 cDNA에 0.5 U의 Taq-polymerase와 5 pmole의 sense와 antisense primer들을 넣고 DNA를 증폭 시켰다 DNA 증폭은 92°C (30 sec), 55°C(30 sec) 그리고 72°C(30 sec)의 순서로 35 cycle을 수행하였다. PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝한 후 염기서열을 분석하여 IHNV-NV 유전자인자의 여부를 확인하였다. pGEM-T vector에 클로닝된 IHNV-NV의 PCR 산물을 *EcoRI*를 사용하여 잘라낸 후 random priming kit (Stratagen)와 [α - 32 P]-dCTP를 사용하여 32 P-labeled DNA probe를 만들었으며 이를 cDNA library의 screening 및 Northern blotting에 사용하였다.

cDNA Library 제조 및 Screening

CHSE-214 세포에 IHNV-PRT를 감염시킨 후 25시간 후에 guanidium thiocyanate-acid phenol-chloroform 법을 사용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA에서 oligo(dT)30-Latex suspension (QIAGEN Inc, USA)을 사용하여 mRNA를 분리한 다음 cDNA cloning kit (Stratagene; ZAP-cDNA Synthesis kit)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA의 합성은 *XhoI* 부위를 지니는 hybrid oligo (dT) linker-primer와 MMLV-RT를 사용하여 수행하였다. DNA polymerase I을 사용하여 dsDNA를 만든 후 *EcoRI* adapter를 붙였다. DNA를 *XhoI*으로 잘라 DNA 양쪽에 *EcoRI*과 *XhoI*의 cohesive end를 만든 후 lambda ZAP vector의 *EcoRI-XhoI* 부위에 ligation 시켰다. Recombinant lambda DNA를 lambda phage에 package한 후 이를 *E. coli* XL1-Blue MRF strain에 감염 시켜 cDNA library를 제조하였다. 앞에서와 같이 제조한 32 P-labelled DNA를 probe로 하여 cDNA library 중 IHNV-PRT의 NV gene에 대한 clone들을 screening하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 기초과학지원센터의 automatic DNA

sequencer (Applied Biosystems, Inc., USA)를 사용하여 수행하였다. DNA 염기서열과 이로부터 유추한 아미노산 서열을 GenBank에 존재하는 유전자들과 비교 분석을 하였다. 유전자의 아미노산 서열을 비교 분석하기 위하여 CLUSTAL W (18) program을 사용하였다. 비교 분석에 사용한 유전자들은 다음과 같다; IHNV-K (X73872), IHNV-WRAC (L40883), IHNV-193 (L40871), IHNV-RB76 (L40880), IHNV-LR73 (L40877), IHNV-RB1 (U47846), IHNV-LWS87 (L40879), IHNV-Carson (L40872), IHNV-CST82 (L40875), IHNV-SRCV (L40881), IHNV-LR80 (L40878), IHNV-COL (L40874), hiram rhabdovirus (U47847), viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV)-0771 (AJ233396).

Northern Blotting

세포에 IHNV NV gene의 발현 양을 측정하기 위하여 Northern blotting을 수행하였다. 세포 시료에서 4M guanidine thiocyanate를 사용한 방법으로 total RNA를 추출하였다. Total RNA 20 µg을 65°C에서 5분간 반응시켜 denature 시킨 다음 3% formaldehyde가 첨가된 1% agarose gel에 전기영동을 하였다. Gel을 EtBr로 염색하여 rRNA의 양 및 상태를 확인한 다음 nitrocellulose membrane에 capillary blot방법으로 transfer하였다. Membrane을 prehybridization 용액 (5× SSC, 45% formamide, 0.5% SDS, 3× Denhardt's solution)을 사용하여 42°C에서 16시간동안 prehybridize 시켰다. 이 용액에 32 P로 label된 probe (1×10⁶/ml)를 첨가한 후 42°C에서 24시간동안 hybridization시켰다. Membrane을 2× SSC 용액으로 상온에서 5분간 2회 세척 그리고 0.1% SDS가 포함된 2× SSC로 상온에서 5분간 2회를 세척한 다음 X-ray film에 감광 시켰다.

Antisense DNA

NV가 IHNV의 증식에 필요한지의 여부를 확인하기 위하여 antisense oligonucleotide를 제작하여 NV의 발현 억제 실험을 수행하였다. 이 실험의 대조구로써 IHNV의 구조단백질인 Glycoprotein (G)유전자의 antisense oligonucleotide도 같이 제작하였다. 본 실험에 사용한 antisense oligonucleotides의 염기서열은 다음과 같다 NV antisense oligonucleotide, 5-TTCGCGGTGGTCCATTGGTCTC-3 (염기서열 -10~+11 부분의 reverse complementary sequence); NV scrambled oligonucleotide, 5-ACAGCAGCATAACGACGAGCAG-3; G antisense oligonucleotide, 5-CATGGTGTCATTGTTTTGGT-3 (염기서열 -9~+12의 reverse complementary sequence); G scrambled oligonucleotide, 5-AAGCTAGACTAACAGCACACA-3. CHSE-214 세포에 IHNV-PRT를 1 moi가 되도록 접종한 후 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. EMEM으로 3회 세척한 다음 FBS가 5% 들어 있는 EMEM을 첨가한 다음 antisense oligonucleotide를 0, 10, 20, 30, 50 uM의 농도로 첨가하였다. 18°C에서 30시간 배양한 다음 배양액에 존재하는 바이러스의 titer를 TCID50 방법으로 측정하였다.

결 과

IHNV의 NV 유전자 클로닝

한국에서 분리된 IHNV-PRT strain의 NV 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 cDNA library를 제조하였다. IHNV-PRT가 감염된 CHSE-214 세포에서 mRNA를 추출한 다음 이로부터 cDNA를 만들었으며 이를 λZAP vector의 EcoRI-XhoI 부위에 ligation시켜 클로닝 하였다. 이와 같이 제조된 cDNA library에서 IHNV-PRT의 NV를 screening하기 위하여 probe를 제조하였다. Probe는 PCR을 사용하여 제조하였는데, 기존에 외국에서 분리되어 보고 (13)된 바 있는 IHNV-WRAC strain의 염기서열로부터 NV의 PCR primer들을 만들었다. 이를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과 260 bp 정도의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 이들이 IHNV의 NV 유전자의 단편이 맞는지 확인하기 위하여 염기서열을 분석한 후 GenBank의 database에 수록된 유전자들과의 유사성을 분석한 결과 각각 IHNV의 NV와 높은 유사성을 보임이 확인되었다. 따라서 이들을 probe로 하여 cDNA library를 screening하였다. 세 차례의 screening과정을 거친 후 IHNV-PRT의 NV의 완전한 길이를 포함하는 클론들을 선별하였다.

```

1 GTAAAAAGAGACA
14 ATGGACCACCGGAAACAACTCAAAACATGGAGGCACCTCAGAGAAGTTCTCGGATACAAGAAGAGGTGGCCGGGA
   M D H R E T N S N M E A L R E V L R Y K N E V A G
59 CACGGCTTCTCTTTAAGGAGGGAGACCTGGTATGGTGTGAAGAGGACGCAACATGGAGGCGGCTTTGGGAT
   H G F L F K E G D L V W C E E D D A T W R R L C D
149 GTGCTCAACGCACTGATCTCTCCAAAGGATGCAGCGAGTATTGTACATGGACCTCAGCATCAGCAAGGGGGAG
   V V N A L I S S K R M Q R V L Y M D L S I T K G E
239 GGGCATCTACTTTTGTGGATCTCCAGGGGACCAAGAACCGCTGTACAAAGAAGCCCAATTTCAGGAGACATCTG
   G H L L F V D L Q G T K N R L Y K E P Q F R R H L
284 ATCCTGATTGAAGACTTCTTCTTATCCAGATAGAAAAAAA 357
   I L I E D F L A Y P R *
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of cDNA coding for NV

염기서열 분석

클로닝된 IHNV-PRT의 NV는 357 bp의 길이를 가지고 있었으며 이들의 서열을 분석한 결과 336 bp의 open reading frame (ORF)이 발견되었으며 111개의 아미노산으로 암호화되어 있고 이로부터 약 13.2 kDa의 분자량을 지닌 단백질이 추정되었다 (Fig. 1).

IHNV-PRT의 NV의 아미노산 서열을 여러 지역에서 분리된

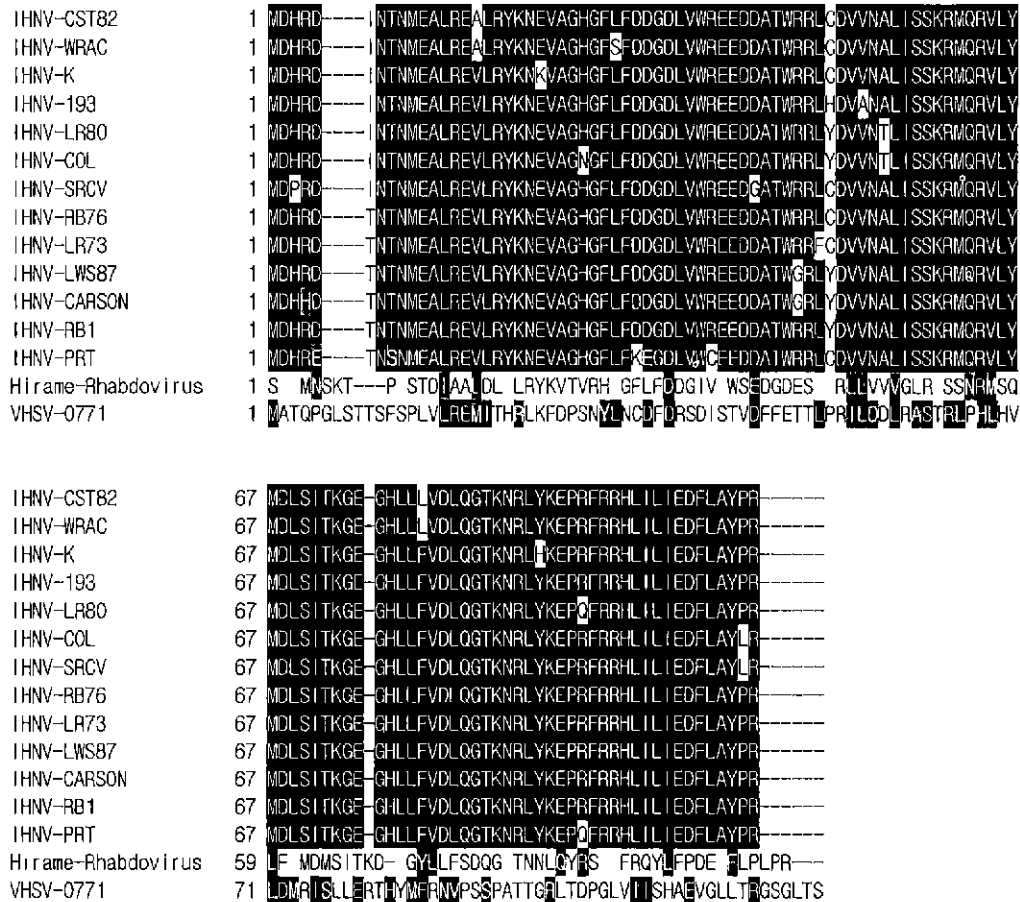


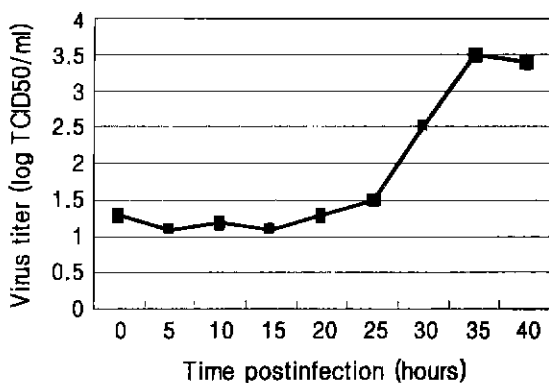
Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences deduced from the NV gene of the IHNV-PRT with those of other fish rhabdoviruses, IHNV-193, IHNV-RB76, IHNV-LR73, IHNV-RB1, IHNV-LWS87, IHNV-CARSON, IHNV-CST82, IHNV-SRCV, IHNV-LR80, IHNV-COL, IHNV-K, IHNV-WRAC, hirame rhabdovirus, and VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia virus). Identical and similar amino acids are indicated by dark and light shading, respectively.

IHNV strain들과 Hrame rhabdovirus 그리고 viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)의 NV 유전자의 아미노산 서열과 비교 분석하였다(Fig. 2). 그림 2A에서 볼 수 있듯이 IHNV-PRT의 NV는 외국에서 분리된 IHNV strain들의 NV들과 90-95% 상동성을 보였다. NV의 상동성을 부분적으로 살펴보면 N-말단 쪽보다는 C-말단 쪽이 높은 상동성을 보였으며 특히 55번째 아미노산 잔기 (Leu)에서부터 79번째 아미노산 잔기 (Leu)까지는 지금까지 보고된 IHNV 모든 strain의 NV 염기서열이 동일하였다. 아직까지 NV의 역할이 무엇인지는 알려지지 않았다. 그러나 여러 strain에 똑같이 존재하는 이 부분이 NV의 역할에 있어서 매우 중요한 역할을 수행함을 예상할 수 있다.

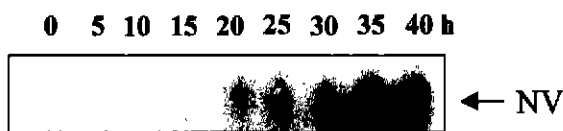
IHNV-PRT의 NV는 hrame rhabdovirus와 VHSV의 NV와는 각각 51%, 10%의 상동성을 보여 오랜 기간동안의 진화과정 중 변이가 발생하였고 그 결과 서로 다른 기능을 수행할 것이라고 추측을 할 수 있다.

IHNV-PRT의 NV의 발현 분석

특정 바이러스 유전자의 역할을 알기 위하여 바이러스 감염의 어느 시기에 발현하는 지를 확인하는 것이 중요하다. NV의 역할을 예측하기 위한 첫 단계로써 바이러스 감염 후 어느 시기부터 발현되는 지의 여부를 확인하기 위하여 Northern blotting을 수행하였다. 바이러스 감염 후 5시간 간격으로 세포의 total RNA를 추출하여 NV의 mRNA의 양을 확인한 결과 감염후 20 시간 정도부터 뚜렷하게 증가하기 시작하였다(Fig. 3B). 바이러스의 성장 곡선과 비교하여 보았을 때 이 시기는 바이러스 감염 말기로써 감염성 있는 바이러스가 만들어지기 시작하는 때임이 확인되었



(a)



(b)

Fig. 3. Expression of NV gene. (A) Growth curve of IHNV-PRT. (B) Northern blotting analysis of NV gene. Total RNA was extracted from virus-infected CHSE-214 cells at selected times and Northern blotting was conducted using NV gene as probe.

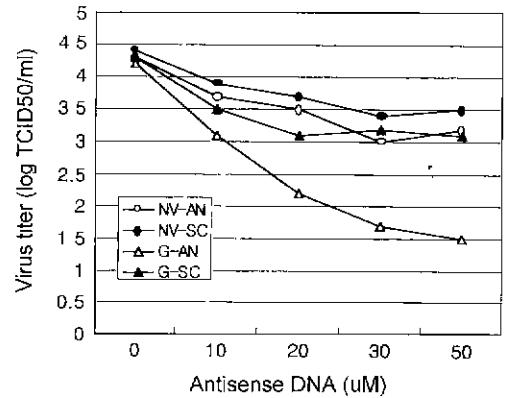


Fig. 4. Effect of antisense oligonucleotides on the growth of IHNV-PRT. IHNV-infected CHSE-214 cells were treated with various concentration of antisense oligonucleotides of G and NV. At 30 h p.i., culture media was collected and virus titre was assayed by TCID50.

다(Fig. 3A). 일반적으로 바이러스 감염 초기는 단백질 및 핵산의 합성이 이루어지고 감염 말기에는 합성된 단백질 및 핵산의 assembly가 이루어진다. 또한 assembly의 결과 만들어지는 virion들이 세포 밖으로 방출된다. 이와 같은 특성으로 미루어 NV는 바이러스 감염 말기의 단백질 및 핵산의 assembly 혹은 virion의 방출 단계에 관여하는 것으로 추측된다.

Antisense Oligonucleotide 처리에 따른 바이러스의 성장 변화

NV가 IHNV의 증식에 필요한지의 여부를 확인하기 위하여 IHNV에 감염된 세포에 NV의 antisense oligonucleotide를 처리한 후 바이러스의 성장을 확인하였다. 대조구로 사용하기 위하여 IHNV의 막단백질로 알려진 G의 antisense oligonucleotide를 처리한 후 바이러스의 성장을 확인하였다. 먼저 G의 antisense oligonucleotide를 처리한 경우 20 uM 이후부터 바이러스의 증식이 1/100이하로 급격히 억제됨이 확인되었다. 반면에 NV의 antisense oligonucleotide를 처리한 경우, 바이러스의 증식이 약 1/10 정도로 감소함이 확인되었다. 그러나 대조구로 사용한 scrambled oligonucleotide를 처리한 경우에도 이와 비슷한 정도의 증식 억제가 일어나 이 결과는 비특이적인 억제효과로 판단된다(Fig. 4). 이 결과로부터 IHNV-PRT가 세포주에서 증식을 할 때 NV는 반드시 필요하지는 않음을 확인할 수 있었다.

고 찰

IHNV의 유전자는 6종류의 단백질을 암호화하고 있다. 이들 중 L, G, N, M1 그리고 M2의 다섯 종류는 IHNV의 virion을 형성하는 구조 단백질들이며 나머지 하나인 NV는 비구조 단백질로써 감염된 세포에서 단백질은 발현되지만 virion에는 들어가지 않는다. 일반적으로 바이러스의 비구조 단백질들은 여러 가지 많은 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그중 중요한 역할로써 다음의 4가지가 있다. 첫째, 바이러스 핵산 및 단백질 합성에 관여, 둘째, 합성된 단백질 및 핵산의 assembly에 관여, 셋째, 바이러스에 감염된 세포의 죽음 (apoptosis)을 조절하는 역할, 마지

막으로 면역반응 등과 같은 숙주의 방어 체계로부터 바이러스를 보호하는 역할 등이다. 아직까지 IHNV의 NV가 어떤 역할을 수행하는 지에 대한 연구는 전혀 되어 있지 않은 상황이다

본 연구에서는 IHNV-NV의 역할을 확인하기 위한 첫 단계로써 IHNV의 NV 유전자를 클로닝하여 이를 분석하였다. 실험 재료로는 한국에서 분리된 IHNV-PRT strain을 사용하였는데, 이 strain은 기존에 보고된 바 있는 IHNV의 어떤 strain과도 혈청학적인 특성이 다른 것이었다(16). 이들의 아미노산 서열을 외국에서 분리된 IHNV strain들의 NV 단백질들과 비교 분석한 결과 90-95%의 상동성을 보여 이들 유전자가 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 이는 IHNV의 NV가 strain과는 무관하게 모든 IHNV가 거의 유사한 구조를 지니고 있으며 IHNV가 살아가는데 필수적인 역할을 수행하고 있음을 나타내주는 것이라고 할 수 있다.

IHNV-PRT의 NV 단백질이 IHNV strain들과는 높은 상동성을 보였지만 다른 종인 HRV 및 VHSV의 NV와는 51%, 10%의 비교적 낮은 상동성을 보였다. 이로부터 이들간에는 진화학적으로 상당히 오랜 시간 전에 분리되어 각각 다른 특성을 지니는 바이러스로 진화하여 나갔음을 나타내 준다.

이와 같이 여러 종류의 IHNV strain에 잘 보존되어 있는 NV가 어떤 역할을 수행할 것인지를 확인하기 위하여 Northern blotting을 수행하였다. 비구조 단백질인 NV가 만약 단백질 및 핵산의 합성에 관여를 한다면 바이러스 감염 초기에 발현될 것이고 반대로 이미 합성된 단백질 및 핵산의 assembly 혹은 virion의 방출에 관여한다면 바이러스 감염 말기에 발현이 증가할 것이다. Northern blotting 결과 바이러스 감염의 말기인 감염 후 20시간 정도에서부터 발현이 증가하였다. 이로부터 NV는 바이러스의 단백질 및 핵산의 합성에 관여하지 않고 감염 말기인 단백질 및 핵산의 결합, virion의 방출 혹은 감염 말기의 어떤 일에 관여할 것임을 확인 할 수 있었다. 만약 NV가 바이러스의 감염 말기 어떤 과정 중에 필수적인 일을 수행하는 경우, NV 유전자의 발현을 억제하면 바이러스의 증식이 억제될 것이다. 이를 확인하기 위하여 IHNV에 감염된 세포에 NV의 antisense oligonucleotide를 처리한 후 바이러스의 증식을 확인하였다. 대조군으로써 IHNV G의 antisense oligonucleotide를 처리한 결과 IHNV의 증식이 심하게 억제된 반면 NV를 처리한 경우에는 NV에 특이한 억제 효과가 나타나지 않았다. 이 결과는 Johnson 등(7)이 NV knock out 바이러스를 사용하여 실험한 결과와 일치하는 것으로써, 세포주에서 fish rhabdovirus가 증식할 때 NV가 필수적이지 않음을 나타낸다.

IHNV가 세포주에서 증식을 할 때 NV가 없어도 된다면 과연 NV의 역할은 무엇일까? 오랜 기간동안의 진화과정을 거친 후에도 NV가 남아 있으며, 지금까지 분리된 모든 IHNV에 NV가 존재하고 또한 그 유전자가 잘 보존되어 있는 것으로 보아 NV는 IHNV가 살아가는 데에 필수적인 역할을 수행한다고 볼 수 있다. 이런 특성을 지닌 NV의 역할로 가장 가능성이 있는 것으로는 숙주의 면역반응과 같은 방어체계로부터의 방어 기작을 담당하는 것이다. 지금까지의 보고에 따르면 여러 종류의 바이러스들이 비구조 단백질을 사용하여 숙주의 면역반응으로부터 바이러

스에 감염된 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 예로써, Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)의 Nef는 바이러스에 감염된 세포의 MHC classI의 발현을 억제하여 cytotoxic T lymphocyte (CTL)의 공격으로부터 바이러스 감염된 세포를 보호한다(5). Vaccinia virus는 soluble type I interferon receptor (20)를 그리고 Myxomavirus는 soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor (22)를 암호화하고 있는데 이를 분비하여 이들 ligand로부터 바이러스 감염된 세포를 보호한다. Cytomegalovirus의 경우 US2, US3, US6 그리고 US11 등의 단백질을 사용하여 바이러스 감염된 세포의 MHC classI 발현을 억제하여 cytotoxic T lymphocyte로부터의 공격을 막고(1) 다른 한편으로는 MHC class I과 유사한 단백질을 만들어 세포 표면에 발현함으로써 natural killer cell로부터의 공격으로부터 바이러스 감염된 세포를 보호하는 역할을 수행한다(6, 18). NV가 이와 유사한 역할을 수행할지의 여부는 바이러스 감염된 세포에서의 MHC class I 발현의 변화여부를 관찰하고 만약 변화가 있는 경우 NV만을 transfection 시켰을 때 같은 현상이 일어나는 지를 확인하여야 할 것이다. 그리고 NV에 돌연변이가 일어난 IHNV 돌연변이를 제작하여 숙주에 감염시킨 후 질병을 유발하는 지의 여부를 확인하면 NV의 역할에 대하여 보다 자세한 이해가 가능할 것이다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 울산대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ahn, K., A. Angulo, P. Ghazal, P. A. Peterson, Y. Yang, and K. Fruh. 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10990-10995
2. Amend, D. F., W. T. Yasutake, and R. W. Mead. 1969. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 98, 796-804.
3. Basurco, B. and A. Benmansour. 1995. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 212, 741-745.
4. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
5. Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397
6. Farrell, H. E., H. Vally, D. M. Lynch, P. Fleming, G. R. Shellam, A. A. Scalzo, and N. J. Davis-Poynter. 1997. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue *in vivo*. *Nature* 386, 10-14
7. Johnson, M. C., B. E. Simon, C. H. Kim, and J. A. Leong. 2000. Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication. *J. Virol.* 74, 2343-2350
8. Kurath, G. and J. C. Leong. 1985. Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion

- rhabdovirus protein. *J. Virol.* 53, 462-468
9. Kurath, G., K. H. Higman, and H. V. Bjorklund. 1997. Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. *J. Gen. Virol.* 78, 113-117
 10. Lannan, C. N., J. R. Winton, and J. L. Fryer. 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20, 671-676.
 11. Leong, J. C., Y. L. Hsu, H. M. Engelking, and D. Mulcahy. 1981. Strains of infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus may be identified by structural protein differences. *Dev. Biol. Stand.* 49, 43-55.
 12. McAllister, P. E. and R. P. Wagner. 1975. Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. *J. Virol.* 15, 733-738.
 13. Morzunov, S. P., J. R. Winton, and S. T. Nichol. 1995. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.* 38, 175-192.
 14. Murphy, F. A. and D. W. Kingsbury. 1990. Virus taxonomy. p. 17. *In* B. N. Field and D. M. Knipe (ed.), *Fields virology*, Vol. 1, 2nd ed. Raven Press, New York.
 15. Nichol, S. T., J. E. Rowe, and J. R. Winton. 1995. Molecular epidemiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Res.* 38, 159-173
 16. Park, M. A., S. G. Sohn, S. D. Lee, S. K. Chun, J. W. Park, J. L. Fryer, and Y. C. Hah. 1993. Infectious hematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.* 16, 471-478.
 17. Pilcher, K. S. and J. L. Fryer. 1980. The viral diseases of fish: a review through 1978. Part I: Diseases of proven viral etiology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 7, 287-364.
 18. Reyburn, H. T., O. Mandelboim, M. Vales-Gomez, D. M. Davis, L. Pazmany, and J. L. Strominger. 1997. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386, 514-517.
 19. Schutze, H., P. J. Enzmann, E. Mundt, and T. C. Mettenleiter. 1996. Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 77, 1259-1263.
 20. Symons, J. A., A. Alcami, and G. L. Smith. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81, 551-560.
 21. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 22. Upton, C., J. L. Macen, M. Schreiber, and G. McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184, 370-382.
 23. Wingfield, W. H., J. L. Fryer, and K. S. Pilcher. 1969. Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 1055-1059.

(Received March 9, 2000/Accepted April 12, 2000)

ABSTRACT: Cloning of the non-virion (NV) of a Korean Isolate of Infectious Hematopoietic Necrosis and Identification of the Role of the NV in IHNV Replication

Chang-Hoon Moon, Wha-Ja Cho, Won-Joon Yoon, Jeong-Jae Park, Jeong-Min Park, Hyun-Ju Kim, Chae-Lyul Lim, Young-Ae Lee, Jeong-Wan Do,¹ Joo-Yang Lee, Myoung-Ae Park,¹ Sang-Gyu Sohn¹, and Jeong-Woo Park* (Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan 680-749, ¹Pathology Division, National Fisheries Research and Development Agency, Pusan 629-900, Korea)

We have cloned and analyzed cDNA coding for non-virion (NV) protein of the IHNV-PRT. The NV gene contained 336 bp open reading frame and encoded a protein of 111 amino acids with a molecular weight of 13.2 kDa. The deduced amino acid sequence of NV of IHNV-PRT was found to be 90~95% identical to those of foreign isolates of IHNV. These results indicate that NV gene of the IHNV is highly conserved among different strains of IHNV. Northern blot analyses revealed that the levels of NV gene expression were strongly elevated after 20 h post-infection. In order to identify the role of NV in the replication of IHNV in fish cells, IHNV-infected cells were treated with antisense oligonucleotides. While IHNV-PRT exposed to glycoprotein (G) antisense oligonucleotide showed severely reduced growth, the growth of virus exposed to NV antisense oligonucleotide was not affected by NV antisense oligonucleotide, which suggests that NV is not essential for replication of IHNV in fish cells.