

관상어로부터 분리한 *Megalocytiviruses*에서 나타나는 ORF25 유전자 부위의 반복서열 특성 분석

진지웅 · 남정희¹ · 김광일 · 홍수희² · 변주영³ · 정현도*

부경대학교 수산생명의학과, ¹국립수산과학원 수산생물방역과
²강릉원주대학교 해양생물공학과, ³한국수력원자력(주) 안전처민원환경팀

Characterization of the Repetitive Sequences Present in the ORF25 Genomic Region of *Megalocytiviruses* from Ornamental Fishes

Ji Woong Jin, Jeong Hee Nam¹, Kwang Il Kim, Suhee Hong²,
Ju Young Byon³ and Hyun Do Jeong*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research &
Development Institute, Busan 619-902, Korea

²Department of Marine Biotechnology, Kangnung-Wonju National University, Kangnung 210-702, Korea

³Hydro and Nuclear Power Co., Ltd., Environmental Management Team Safety &
Environment Department, Seoul 135-791, Korea

The presence of ISKNV-like viruses in various freshwater ornamental fish species imported from Asia was confirmed by polymerase chain reaction(PCR) amplification of the ATPase(adenosine triphosphatase) gene. Interestingly, molecular analyses of the Open Reading Frame 25(ORF25) region of these isolates based on the ISKNV(Infectious spleen and kidney necrosis virus) genome revealed the presence of various repetitive sequences. ORF25 repeat sequence length had no effect on cumulative mortality of rock bream *Oplegnathus fasciatus* challenged with tissue homogenates of infected pearl gourami, *Trichogaster leeri*; silver gourami, *Trichogaster microlepis*; blue gourami, or *Trichogaster trichopterus*. All isolates induce cumulative mortalities after 12 days of infection, confirming that ORF25 polymorphism did not affect the pathogenicity of ornamental fish megalocytiviruses that cross infect rock bream, a seawater fish. Also, no statistically significant differences in spleen index or viral copy number in infected tissues was detected between isolates with varying ORF25 repeat sequence lengths. However, further studies are necessary to fully characterize the functional characteristics of these polymorphisms in megalocytivirus disease in ornamental fishes.

Key Words : Polymorphism, Repetitive sequences, Freshwater ornamental fish, *Megalocytivirus*.

서 론

Iridoviridae family는 지난 두세기 동안 어류양식에 있어 심각한 경제적 손실을 일으키는 병원체로 알려졌다 (Jeffrey et al., 2006). Iridoviridae family는 *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, 그리고 *Megalocytivirus*(Chinchar et al., 2005) 등 5개의 genera로 분류되며 이중 *Megalocytivirus* 속에 속하는 종들이 다양한 어류에서 높은 폐사를 유도 한다. 최근에는 Iridoviridae 과의 대표 종인 ISKNV(Infectious spleen and kidney necrosis virus)와 유전적으로 유사한(ISKNV-like iridoviruses) megalocytiviruses 가 red drum(*Sciaenops ocellata*)(Weng et al., 2002), murray

cod(*Maccullochella peelii*)(Lancaster et al., 2003), African lampeye(*Aplocheilichthys normani*)(Sudthongkong et al., 2001), brown-spot grouper(*Epinephelus tauvina*)(Chua et al., 1994), turbot(*Scophthal musmaximus*)(Kim et al., 2005), dwarf gourami(*Colisa lalia*)(Paperna et al., 2001) 등의 담수어에서 보고되고 있다.

Iridoviridae 과의 바이러스는 DNA의 환상 변이와 최종 끝 부위가 반복되는 독특한 특성을 가진다. 이러한 반복서열은 LCDV-1, CIV, RSIV 등에서 보고된바 있으며 (Samalecos, 1986; Fischer et al., 1988; Walker and Hill, 1980), megalocytivirus의 대표 종인 ISKNV(He et al., 2001)에서도 Open Reading Fame 25(ORF25) 부위에서의 반복서열이 보고되었다. 그러나 이러한 반복서열이 유전적으로 megalocytivirus strain간에 다양성을 나타내는지 또는 어떤 병리적 특성에 관

*Corresponding author: jeonghd@pknu.ac.kr

여하는지에 관한 보고는 없다. 이에 비하여 사람에서 발병되는 varicella-zoster virus의 반복서열은 피부의 병원성을 일으키는 데 유리하게 작용한다는 보고가 있으며(Sauerbrei et al., 2007), Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus(KSHV)가 속하는 gamma-herpesvirus에서는 반복서열이 latency 및 다양한 유전자 발현조절에 관여한다는 보고가 있다(Nagendra et al., 2007). 본 연구에서는 담수산상어에서 심각한 폐사를 일으키는 ISKNV-like 바이러스 간의 유전적 다양성에 대한 분석을 반복서열이 존재하는 ORF25 부위를 서로 비교하여 실시하였다.

Megalocytivirus 감염어에서 나타나는 특징적 증상은 정상어에 비해 매우 비대해진 비장조직이 관찰되고, 이러한 감염조직을 슬라이드에 도말하여 광학현미경으로 관찰하여 보면 다량의 비정형비대세포가 관찰되는 것이다. 그런데 현재까지 다양한 megalocytiviruses의 유전적 변이주간에 나타나는 이러한 특징적 임상증상의 변화와 감염의 정도(severity of infection)와의 정량적인 상관관계는 분석 되어져있지 않다. 즉 반복서열 분석을 통하여 나타난 megalocytivirus 변이주는 ① 병리적 증상인 조직(비장)증대에서 전부 동일한 정도의 비장크기 증대를 유도하는가? ② 진단적 측면에서 감염조직은 각기 다른 바이러스 농도를 나타내는가? 하는 것에 대한 분석은 이루어지지 않았다.

그러므로 본 연구에서는 megalocytivirus의 반복서열 분석을 통해 변이주라고 할 수 있는 megalocytiviruses 각각의 유전적 특성을 비교하고, 이들 각각에 감염된 어류가 나타내는 병리적 변화인 spleen index라는 개념을 도입하여 정량적이고 수치적으로 비교·분석하였으며, 감염된 내부 장기의 바이러스 농도를 real-time PCR을 이용하여 비교·분석함으로써 숙주에서의 병리적 변화 그리고 바이러스의 증식 능력 변화라는 측면에서의 병원성 비교를 실시하였다.

재료 및 방법

바이러스

실험에 사용된 바이러스는 2005년부터 2009년까지 중국과 싱가포르에서 수입된 pearl gourami(*Trichogaster leeri*; b.w. 4.0 ± 1.0 g), silver gourami(*Trichogaster microlepis*; b.w. 4.0 ± 1.0 g), blue gourami(*Trichogaster trichopterus*; b.w. 4.0 ± 1.0 g) 중 수입 직후 megalocytivirus의 전형적인 감염증상을 보이는 어류의 비장으로부터 Kurita et al. (1998)에 의해 보고된 ATPase(Adenosine triphosphatase) 부위의 3F/3R primer set를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하여 감염 여부를 확인하였고 또한 비장의 비대와 비정형비대세포를 확인하였다. 확인된 PCR 생성물을 cloning하고 염기서열을 분석한 후 다른 megalocytivirus의 염기서열과 비교한 결과 ISKNV-like strain으로 분류되었고, PGIVc, PGIVsp 그리고 SGIVsp 이라 명명하였다(Table 1). 감염된 비장조직은 사용 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

바이러스의 핵산 분리

감염어의 비장 10 mg으로부터 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 최종 50 μL 의 elution buffer를 사용하여 핵산을 분리하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20°C 에서 보관하였다.

PCR primer

Megalocytivirus의 감염확인을 위해 사용한 primer는 Kurita et al. (1998)에 의해 보고된 ATPase 부위의 3F/3R primer set를 이용하였고, 반복서열의 확인 및 구별을 위해 ORF25 부위를 포함하는 IG1F/IG1R의 primer set를 제작하고 염기서열 분석을 실시하였다(Table 2). 또한 real-time PCR을 위해 MCP(Major capsid protein) 부위에 MC1F/MC1R의 primer set를 제작하였다(Table 2).

PCR

PCR은 microtube에 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.001%(w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200 μM 의 각각의 dNTP, 1 μM 의 각각의 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 주형 DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후, 증류수로 PCR 혼합물 최종량이 50 μL 가 되게 하였다. PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler(Perkin-Elmer)를 사용하였으며, PCR 조건은 94°C 에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension하여 30 cycles 반응시켰다. 그 후, 72°C 에서 7분간 post-extension 시켰다. 증폭된 산물은 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide(EtBr)가 첨가된 1% agarose gel을 완충액 5X TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영동을 실시한 후 특이적 밴드를 관찰하였다.

ORF25 부위의 염기서열 결정

반복서열이 포함된 ORF25 부위의 염기서열을 확인하기 위해 IG1F/IG1R의 primer set를 이용하여 PCR을 실시하였고, PCR 생성물은 Prep-A-Gene DNA Purification System(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 정제하였으며, TOPO-TA vector에 제조사의 방법에 따라 삽입시켰다. 그리고 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit(ABI PRISM, Applied Biosystems)와 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, ORF25 부위에 대한 각 megalocytivirus의 염기서열은 MACAW program(Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 비교하였다.

공격실험

반복서열분석을 통해 분류된 변이주간의 병원성의 차이를 확인하기 위해 다른 반복서열을 보이는 두 megalocytivirus

Table 1. PCR primers used in this study

Genomic region	Primers	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)	Expected size of amplicons	Object	Reference
ATPase	3F	CAAACCACAGCGCGCAAGT	563 bp	Detection	Kurita et al. (1998)
	3R	GCCAAGCGGCACATAATT			
ORF25	IG1F	CGGATGGCATTGTAGGC	1551 bp	Differentiation and cloning	This study
	IG1R	ACAAAAGAGTCCGAGAGATC			
MCP	MC1F	GAAGTGGATGCGCACCTC	163 bp	Quantification	This study
	MC1R	CAAGATGATTGGCATGCG			

Table 2. Megalocytivirus isolates used in this study

Strain name	Origin	Imported	
		Year	Country
PGIVsp	Pearl gourami (<i>T. leeri</i>)	2005	Singapore
PGIVc1		2008	China
PGIVc2		2007	China
SGIVsp	Silver gourami (<i>T. microlepis</i>)	2007	Singapore

인 PGIVsp와 SGIVsp를 돌돔에 공격실험을 실시하였다. 감염 조직 마쇄액을 100 µg/fish 농도로 100 µL씩 돌돔(b.w. 8±1.0 g)에 각각 10마리씩 주사하였으며, 음성대조군으로는 멸균된 PBS(pH 7.2) 100 µL씩 돌돔 10마리에 복강주사하여 폐사율을 관찰 하였다.

폐사어는 즉시 사육 수조에서 제거하여 어체중(g)과 비장 무게(mg)를 측정하였고, 조직병리학적 관찰과 PCR을 이용하여 megalocytivirus의 감염을 확인하였다.

Real-time PCR

감염어의 megalocytivirus DNA의 정량을 위해 Rotor-Gene™ 6000(Corbett Research, AUS)을 사용하였다. Microtube에 SensiMixPlus SYBR(Quantace, USA) 10 µL, 1 µM의 각각의 primer, template DNA로서 plasmid DNA 또는 추출된 핵산을 첨가한 후, 증류수로 PCR 혼합물 최종량이 20 µL가 되게 하였다. Real-time PCR의 조건은 95°C에서 10분간 반응한 후, 95°C 10초, 55°C 15초, 72°C 20초의 반응을 40 cycles로 반응시켰다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지의 영역에서 용융점(melting temperature, *Tm*) 분석을 실시하였다.

표준검량곡선을 작성하기 위해 megalocytivirus PGIVsp의 genomic DNA를 주형으로 하여 MC1F/MC1R primer set(Table 1)를 사용하여 PCR을 실시하였고, 생성된 PCR 생성물을 pGEM-T Easy vector(Promega, USA)에 ligation 하여 *E. coli* DH5 α 균주에 cloning시킨 후 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA의 copy 수를 정량하기 위해 QuantiT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits(Invitrogen Co.,

Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 10¹-10⁹ copies/ µL로 10배씩 단계 희석하여 real-time PCR 시 표준검량곡선을 구하는데 사용하였다. Plasmid DNA는 실험할 때마다 새로 희석하여 사용하였으며, 같은 plasmid DNA에 대하여 3번씩 수행하였다.

Spleen index

폐사하거나 빈사상태인 어류의 어체중(g)을 측정하고 곧바로 개봉하여 비장을 적출한 다음 미량저울을 이용하여 비장무게(mg)를 측정하였다. Spleen index는 아래의 식과 같이 비장무게(g)를 어체중(g)으로 나눈 후 1000을 곱해주어 비장 무게를 mg 단위로 환산하여 산출하였다.

$$\text{Spleen index} = \frac{\text{Spleen weight (g)}}{\text{Body weight (g)}} \times 1000$$

결 과

다양한 megalocytivirus의 확인과 ORF25 유전자의 다양성

2005년부터 2009년까지 중국과 싱가포르에서 수입된 pearl gourami, silver gourami, blue gourami 중 체색 흑화와 함께 비장 증대를 보이는 어류를 선별하여 megalocytivirus ATPase 유전자에 특이적인 3F/3R primer set를 이용하여 PCR을 실시한 결과 다양한 담수관상어에서 megalocytivirus가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 1a). 감염이 확인된 관상어로부터 분리된 DNA를 대상으로 반복서열의 존재가 보고된 ORF25 부위에 특이적인 IG1F/IG1R primer set를 이용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과ATPase 유전자를 목표로 한 PCR 결과와는 달리 분리주는 각각 다른 크기의 생성물이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

ORF25 유전자의 염기서열 분석

ORF25에 특이적인 IG1F/IG1R primer를 사용한 PCR의 결과에서 서로 다른 크기를 보이는 것으로 나타난 PGIVsp(Fig. 1, lane 1), PGIVc1(Fig. 1, lane 3), PGIVc2(Fig. 1, lane 4), SGIVsp(Fig. 1, lane 5)의 PCR 생성물에 대한 유전자 염기서열을 분석하였다. 그 결과 각각의 분리주는 반복서열의 반복횟

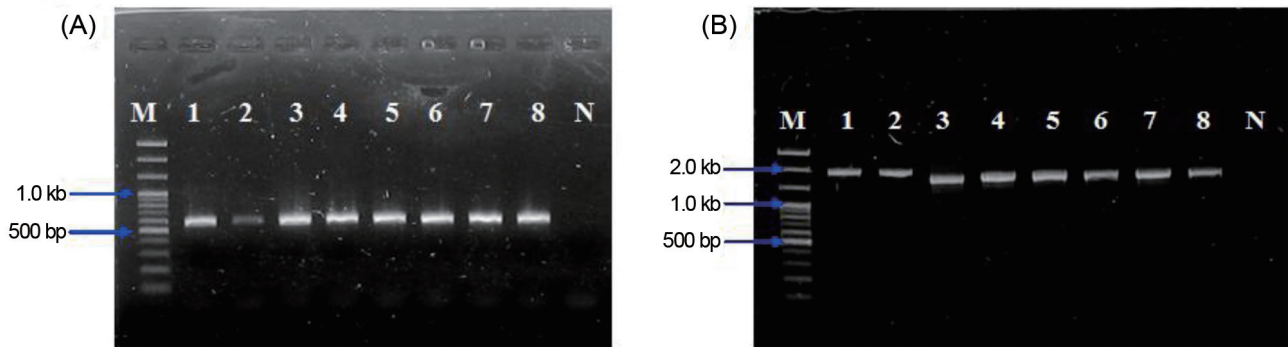


Fig. 1. Detection and differentiation of megalocytiviruses from ornamental fishes by PCR targeted other regions. (A) ATPase gene; (B) ORF25 gene. Megalocytivirus from pearl gourami (Singapore), pearl gourami (Singapore), pearl gourami (China), pearl gourami (China), silver gourami (Singapore), blue gourami (Singapore), blue gourami (Singapore), and pearl gourami (Singapore) corresponding to lane 1-8 of (A) and (B), respectively. M, 100 bp DNA ladder; N, negative control.

수 또는 염기서열의 차이에 의하여 서로 다른 크기의 ORF25 유전자를 포함하고 있었는데, PGIVsp, PGIVc1, PGIVc2 그리고 SGIVsp는 intergenic 부위를 포함하여 각각 410 bp(134 aa), 409 bp(119 aa), 409 bp(131 aa) 그리고 401 bp(135 aa)으로 다르게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1b). 또한 모든 변이주의 ORF25 염기서열은 큰 차이를 보였지만, ISKNV(AF371960)의 ORF25 유전자와 마찬가지로 5'-ACCACAGGCTGAC-3'의 염기서열이 모든 변이주에서 반복 되었으며, 그 횟수는 각각 13, 13, 14 그리고 11번씩으로 다르게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

ORF25 유전자 변이주의 감염 특성 비교

Megalocytivirus에 감수성이 높은 어종인 돌돔에 반복서열 분석을 통해 분류된 변이주인 PGIVsp와 SGIVsp를 10마리씩 복강주사하여 반복서열의 차이에 의한 병원성의 차이를 확인한 결과 두 그룹 모두 7일째 폐사가 시작되어 12일째 100% 폐사함을 확인할 수 있었으며, 음성대조군에서는 폐사가 일어나지 않았다. 따라서 본 실험에서는 ORF25 부위의 반복서열의 차이에 의해 분류된 바이러스 변이주 간에 나타내는 돌돔에 대한 폐사율의 차이를 확인할 수는 없었다. 또한 병리학적 병변인 spleen index는 PGIVsp의 경우 2.44와 3.37을 보였으며, SGIVsp의 경우 2.63으로 나타나 통계적으로 그룹간 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 3).

ORF25 유전자 변이주의 복제 능력 비교

Megalocytivirus의 MC1F/MC1R 부위가 포함된 plasmid를 이용한 표준검량곡선에서 plasmid DNA의 copy 수와 threshold cycle(CT)값 사이의 상관관계 계수인 r^2 은 0.99로 나타나 표준 검량곡선으로 사용하기에 적당하였다(data not shown).

반복서열분석을 통해 분류된 변이주인 PGIVsp와 SGIVsp에 감염된 돌돔의 조직내 megalocytivirus의 바이러스의 농도 차이를 확인하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 그 결과 PGIVsp와 SGIVsp를 공격하여 폐사한 돌돔의 평균 viral copy

number는 각각 7.58×10^8 와 8.81×10^8 copies/mg의 값을 나타내었으며, 그룹 간의 차이를 보였지만 통계적으로 두 그룹 간 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

ISKNV를 대표 strain으로 하는 megalocytivirus는 광범위한 종류의 담수관상어에서 폐사를 일으키며, 해산어에 대하여서도 교차감염을 일으켜 양식산업에 높은 위험성을 보일 수 있는 어류 병원성 바이러스이다(Sudthongkong et al., 2001; He et al., 2001; Paperna et al., 2001; Jeong et al., 2008). 그러므로 현재 동남아시아를 중심으로 한 국제적인 담수관상어의 교역증대는 megalocytivirus에 감염된 담수관상어에 의한 각국의 관상어뿐만 아니라 양식해산어까지도 감염의 위험성이 증가하고 있어 이에 대한 다양성 및 유전적 변이에 대한 정확한 정보가 매우 중요한 시기에 있다고 할 수 있다.

Iridoviridae 과는 반복서열이라는 독특한 유전적 구조의 존재에 대한 보고가 되어있으나 아직도 다양한 종류의 담수관상어에서 분리된 megalocytivirus와 해산양식어에서 분리된 megalocytiviruses의 비교에 있어서 DNA의 염기차이에만 치중 되어 있고, 다양한 변이를 나타낼 수 있는 반복서열의 유전적 변화와 특성에 대한 비교연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 다만 최근에 Nam (2009)은 중국에서 수입된 pearl gourami에서 Iridoviridae과에 속하는 ISKNV-like 바이러스(PGIVsp)를 분리하였으며, K2 region(RSCR-K2)의 염기서열 비교분석을 통하여 PGIVsp DNA에서 나타나는 반복서열의 다양성에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 대표균주인 ISKNV에서 또 다른 반복서열을 포함한 부위인 ORF25 유전자에서 나타나는 PGIVsp와 SGIVsp의 다양성에 대한 분석과 이들 다양성이 병원성에 미치는 영향은 분석되지 않았다.

본 연구에서는 수입된 관상어가 한국의 관상어 도매상에서 보관 10일 이내에 폐사가 일어난 담수관상어로부터 얻어진 다양한 megalocytivirus의 ORF25 부위에서 나타나는 반복서열의

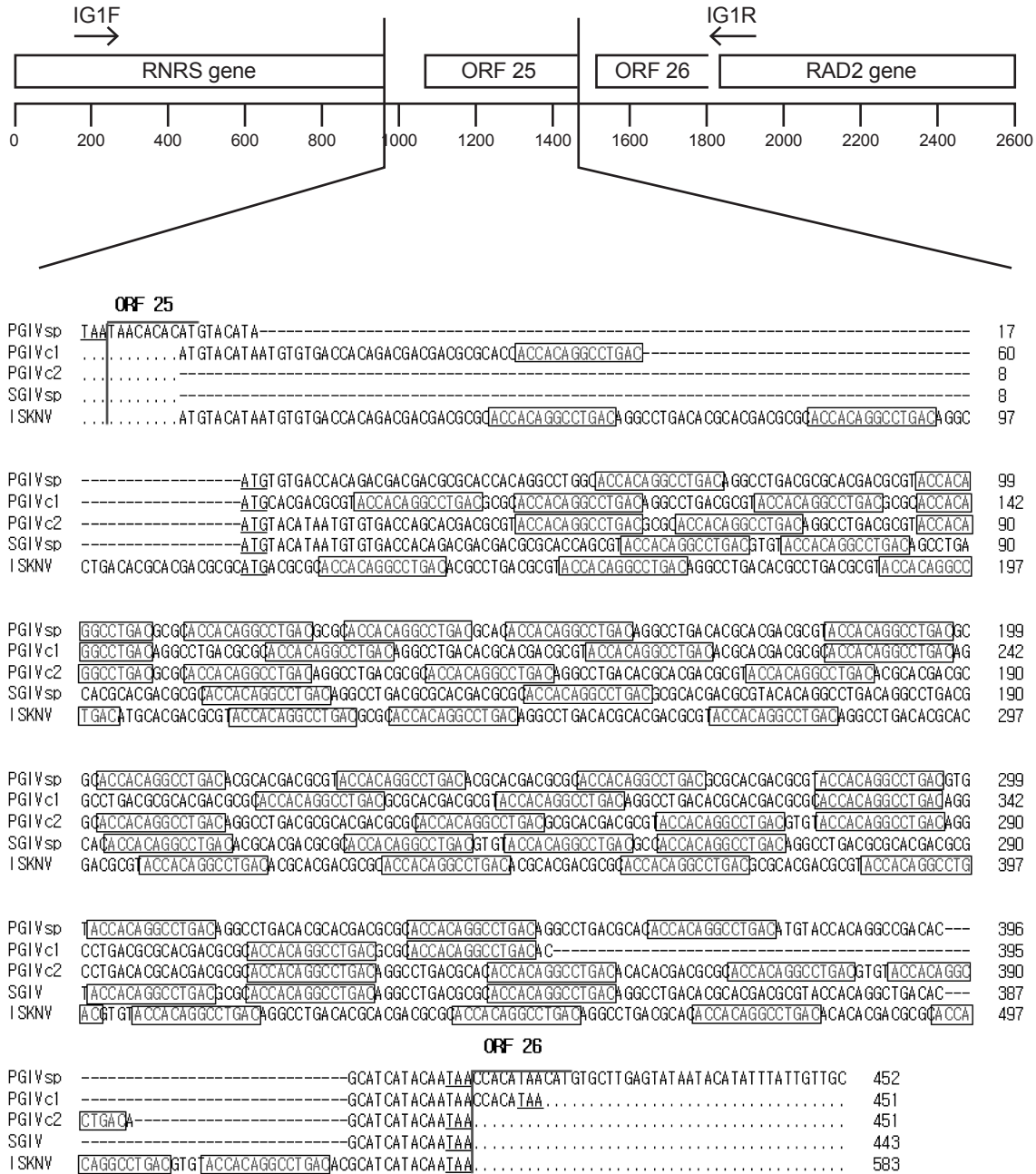


Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequences of the ORF25 gene in megalocytivirus isolated from pearl gourami and silver gourami. Each megalocytiviruses PGIVsp, PGIVc1, PGIVc2 and SGIVsp are corresponding to those of lane 1, 3, 4, 5 of Fig. 1. Identical residues and gaps are represented as dots and dashes, respectively. Repeating sequence, 5'-ACCACAGGCCTGAC-3' is boxed with solid line. The start codon and stop codon are underlined.

다양성을 i) PCR에 의한 생성물의 길이를 통하여 정성적 분석을 실시하고, ii) 정량적 분석을 위하여 real-time PCR을 통한 감염 조직 내에 있는 바이러스의 농도비교를 실시하였으며 iii) 돌돌에 대한 공격실험을 통해 이들 다양성에 따른 병리적 병변 및 병원성의 차이를 분석하였다.

먼저 중국과 싱가포르에서 수입된 pearl gourami, silver

gourami 그리고 blue gourami 중에서 체색흑화 및 비장증대를 보이는 어류를 대상으로 megalocytivirus ATPase 유전자에 특이적인 PCR을 수행한 결과 양성을 보이는 시료를 확인 할 수 있었다(Fig. 1a). ATPase 유전자의 염기배열분석에서 이들 분리주는 모두 megalocytivirus subgroup 3에 속하는 ISKNV-like 바이러스로 분류되었으며, 분리주간의 유전적 유사도는 100%

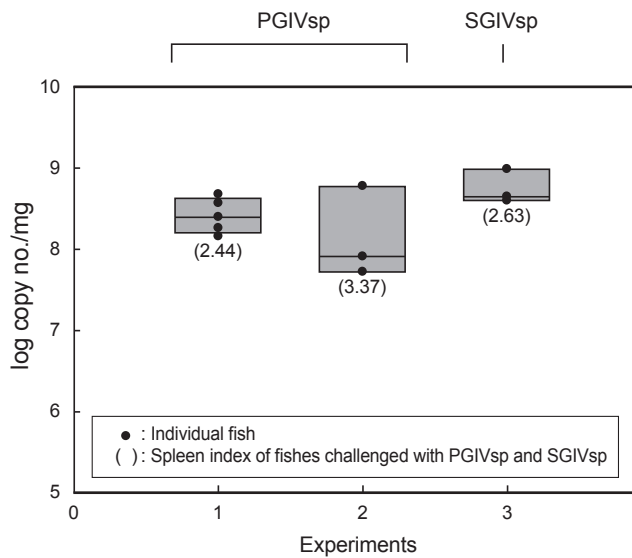


Fig. 3. Relationship between viral copy number and spleen index of rock bream infected with PGIVsp and SGIVsp.

로 나타냈다(data not shown). 그러나 이들 각각의 분리주는 ORF25를 목표로 한 PCR에서는 서로 각기 다른 길이의 증폭 산물을 생성함을 전기영동상으로 확인할 수 있어 모든 분리주에서 동일길이의 증폭산물을 생성하는 ATPase 유전자에 특이적인 PCR과는 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1b). 따라서 분리주 8개중 4개를 선정하여 ORF25 유전자 염기서열을 분석한 결과 ATPase 유전자나 다른 유전자에 비해 유전적으로 큰 차이를 보였다. 이런 각각의 변이주는 ORF25 유전자 부위에서 5'-ACCACAGGCCTGAC -3'의 염기배열이 11-14번 반복되며, 그 반복 횟수는 변이주마다 다르게 나타났다(Fig. 2). 이러한 특징적 반복서열은 megalocytivirus genus의 대표 strain인 ISKNV(AF371960)의 ORF25 유전자에서도 나타나며, 17번 반복 된다(He et al., 2001). 또한 RBIV(AY532606), RSIV(BD143114) 그리고 TRBIV(GQ273492)에서도 ORF25에 상응하는 부위에서는 각각 7, 3 그리고 5번씩 반복됨을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 반복서열은 염기서열의 개수 및 순서에 따라 다양한 형태로 존재하므로 Jeong et al. (2003)의 보고와 같이 모든 경우를 포함시켜 재정리 할 필요가 있을 것이다. 또한 이러한 반복서열의 차이가 PCR의 특성에 의한 잘못된 산물이 아니라는 것은 반복서열 부위의 염기서열 분석을 위하여 제조한 plasmid(pUC18-ORF25)를 단계 희석하여 nested PCR에서 생성물 확인이 되지 않는 농도까지 낮추어도 동일한 amplicon을 생성하는 것으로 확인 하였다(data not shown).

흥미로운 것은 ORF25와 RNRs(Ribonucleotide reductase small subunit) 유전자의 intergenic 부위에서도 반복서열이 나타남을 확인할 수 있어 본 연구의 반복서열 특성이 ORF 내에서의 변화로 제한할 수는 없는 것으로 생각된다. 더구나 ISKNV의 총 염기배열에서 ORF25로 보고되어 있는 이 부위는 RSIV의 총 염기배열 보고에서는, intergenic 부위로 보고하고 있어 ORF25

가 과연 진실된 ORF인지에 대한 연구도 충분히 비교 연구 되어야 할 것이다.

반복서열의 기능적 분석에 대한 보고는 varicella-zoster virus(Moffat et al., 1998), Epstein-Barr virus(EBV) 그리고 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) 같은 gamma type-herpesvirus 등에서는 일부 되어 있으나(Nagendra et al., 2007) Iridoviridae 과에 속하는 strain에서의 반복서열 특성비교와 그 기능적 분석은 되어 있지 않다.

본 연구에서는 megalocytivirus 변이주간에 나타나는 반복서열 특성의 차이가 병원성에 어떠한 영향을 미치는가를 분석하기 위하여 ORF25 부위에서 반복서열 특성이 다르게 나타난 두 megalocytivirus 변이주인 PGIVsp 와 SGIVsp를(Fig. 1의 lane 1 과 lane 5) 돌돔을 대상으로 공격실험을 실시하였다. 그 결과 두 그룹 모두 7일째 폐사가 시작되어 12일째 100% 폐사함을 확인할 수 있었으며, 음성대조구에서는 폐사가 일어나지 않았다. 그러므로 반복서열이 병원성의 변화에 영향을 미치는 varicella-zoster virus(VZV)과는(Sauerbrey et al., 2007) 달리 megalocytivirus의 ORF25 부위의 반복서열이 직접적으로 그 병원성에 영향을 미치는 유전적인 요인으로 보여 지지는 않는 것으로 추정되어졌다.

특징적인 반복서열에 의한 변이주간에 나타날 수 있는 돌돔의 병리적 변화 및 바이러스 증식능력 변화를 각각 spleen index와 real-time PCR을 이용한 감염조직내의 바이러스 농도를 비교 분석하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 pearl gourami와 silver gourami로부터 확인된 반복서열 변이주를 각각 돌돔에 공격실험을 하였을 때 spleen index는 각각 2.44와 3.37 그리고 2.63으로 나타나 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이를 확인할 수 없었다. 또한 각각의 돌돔조직 내에 존재하는 바이러스의 농도 또한 real-time PCR을 이용하여 정량적으로 비교한 결과 pearl gourami 및 silver gourami로부터 분리한 반복서열 변이주 모두 통계적으로 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 앞서서의 폐사율과 마찬가지로 ORF25 부위의 반복서열의 차이가 megalocytivirus의 복제속도나 병리적 변화의 차이와는 상관없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 viral copy number나 spleen index가 다른 megalocytivirus인 TGIV, LYCIV 그리고 LMBV와 큰 차이를 보이지 않아 이러한 결과를 더욱더 뒷받침해 주고 있다(Chao et al., 2002; Wang et al., 2006; Goldberg et al., 2003).

결론적으로 본 연구에서는 국내로 수입되는 3종의 pearl gourami, blue gourami, silver gourami로부터 ① megalocytivirus의 감염실태를 PCR을 이용하여 분석하였으며, ② 분리한 megalocytivirus는 ORF25 부위에서 반복서열이 다양하게 나타나며, ③ 그러한 megalocytivirus의 반복서열 변이주간에 의해 나타나는 숙주의 병적 증상/바이러스의 증식능력의 변화 또는 폐사율에 의한 병원성 비교 모두에서 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

그러나 향후 반복서열 변이주의 발생원인 그리고 또 다른 반복서열이 포함된 부위에서의 유전적 특성비교와 함께 담수관상

어를 통한 새로운 megalocytivirus의 국내 유입에 대한 위험성 제고에 대한 충분한 연구와 제도적 준비가 이루어져야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(구 한국학술진흥재단)의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008 -313-F00079).

참고문헌

Chao CB, Yang SC, Tsai HY, Chen CY, Lin CS and Huang HT. 2002. A nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan(TGIV) in cultured hybrid grouper, giant seaperch, and largemouth bass. *J Aquatic animal health* 14, 104-113.

Chinchar VG, Essbauer S, He JG, Hyatt A, Miyazaki T, Seligy V and Williams T. 2005. Iridoviridae. In "Virus Taxonomy: VIII Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses", Elsevier, London, U.K., 163-175.

Chua FHC, Ng ML, Ng KL, Loo JJ and Wee JY. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *J Fish Dis* 17, 417-427.

Fischer M, Schnitzler P, Scholz J, Rosen-Wolff A, Delius H and Darai G. 1988. DNA nucleotide sequence analysis of the *Pvu* II DNA fragment L of the genome of insect iridescent virus type 6 reveals a complex cluster of multiple tandem, overlapping and interdigitated repetitive DNA elements. *Virology* 167, 497-506.

Goldberg TL, Coleman DA, Grant EC, Inendino KR and Philipp DP. 2003. Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *J Virol* 77, 8812-8818.

He JG, Deng M, Weng SP, Li Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ and Chan SM. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* 291, 126-139.

Jeffrey G, Lancaster M, Deece K, Dhungyel O and Whittington R. 2005. The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod(*Maccullochella peelii peelii*) and dwarf gourami(*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. *Mol Cell Probes* 20, 212-222.

Jeong JB, Jun LJ, Yoo MH, Kim MS, Komisar JL and Jeong HD. 2003. Characterization of the DNA nucleotide sequence in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture* 220, 119-133.

Jeong, JB, Cho HJ, Jun LJ, Hong SH, Chung JK and Jeong HD. 2008. Transmission of iridovirus from freshwater ornamental fish(pearl gourami) to marine fish(rock

bream). *Dis Aquat Organ* 82, 27-36.

Kim WS, Oh MJ, Jung SJ, Kim YJ and Kitamura S. 2005. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea. *Dis Aquat Organ* 64, 175-180.

Kurita J, Nakajima K, Hirono I and Aoki T. 1998. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus(RSIV). *Fish Pathol* 33, 17-23.

Lancaster MJ, Williamson MM and Schroen CJ. 2003. Iridovirus-associated mortality in farmed Murray cod(*Maccullochella peelii peelii*). *Aust Vet J* 81, 633-634.

Moffat JF, Zerboni L, Kinchington PR, Grose C, Kaneshima H and Arvin AM. 1998. Attenuation of the vaccine Oka strain of varicella-zoster virus virulence demonstrated in the SCIDhu mouse. *J Virol* 72, 965-974.

Nagendra NT, Susanne EG, Beatrix S, Klaus F, Andreas W and Heiko A. 2007. A gammagerpesviral internal repeat contributes to latency amplification. *Pros* 10, 1371-1372.

Paperna I, Vilenkin M and Matos AP. 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis Aquat Org* 48, 17-25.

Samalecos CP 1986. Analysis of the structure of fish lymphocystis disease virions from skin tumors of *Pleuronectes*. *Arch Virol* 91, 1-10.

Sauerbrei A, Zell R and Wutzler P. 2007. Analysis of repeat units in the R2 region among different Oka Varicella-Zoster virus vaccine strains and wild-type strains in Germany. *Virol* 5, 40-44.

Sudthongkong C, Miyata M and Miyazaki T. 2001. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis Aquat Org* 48, 163-173.

Walker DP and Hill BJ. 1980. Studies on the culture assay of infectivity and some *in vitro* properties lymphocystis virus. *J Gen Virol* 51, 385-395.

Wang XW, Ao JQ, Li QG and Chen XH. 2006. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon. *J Virol Methods* 133, 76-81.

Weng SP, Wang YQ, He JG, Deng M, Lu L, Guan HJ, Liu YJ and Chan SM. 2002. Outbreak of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata*(L.), cultured in southern China. *J Fish Dis*, 25, 681-685.

Nam JH. 2009. Molecular characterization of iridovirus isolated from freshwater ornamental fish. A Master's Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, 1-75..

2011년 4월 8일 접수
 2011년 6월 17일 수정
 2011년 7월 4일 수리