

## Determination of subcellular localization of Betanodavirus B2

김영미 · 차승주\* · 문창훈 · 도정완\* · 박정우  
울산대학교 생명과학부, \*국립수산과학원 병리연구팀

### ABSTRACT

To analyze subcellular localization of betanodavirus protein B2, a plasmid expressing Betanodavirus protein B2 fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP-N1) was constructed. The transient expression of full-length B2 fused to EGFP in GF cells confirmed the equal distribution of protein B2 between cytoplasm and nucleus. However, transfection of N-terminal half of the B2 revealed that this truncated form predominantly localized to the cytoplasm. By using several deletion mutants and point mutants, we determined the regions and/or motif responsible for the subcellular localization of betanodavirus.

### INTRODUCTION

Family nodaviridae에는 곤충에 감염하는 alphanodavirus와 어류에 감염하는 betanodavirus 등의 2개 genus가 존재한다. Nodavirus는 RNA virus로서 RNA1과 RNA2 등의 2개 genomic RNA를 지니고 있다. RNA1은 viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, protein A)를, 그리고 RNA2는 capsid protein을 암호화한다 (Schneemann *et al.*, 1998). Nodavirus가 세포에 감염하면 RNA1으로부터 약 387-nucleotide의 subgenomic RNA3가 만들어진다. Betanodavirus의 경우 RNA3로부터 protein B2가 만들어지는데 (Sommerset & Nerland, 2004; Iwamoto *et al.*, 2005), protein B2의 정확한 기능은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 그러나 protein B2가 RNA-silencing-suppression activity를 지니며 (Iwamoto *et al.*, 2005), B2의 활성이 바이러스 RNA 증식에 필요하다는 보고가 있다 (Fenner *et al.*, 2006). 이와 같은 B2의 기능이 어떤 기작에 의하여 이루어지는지, 그리고 다른 기능을 수행하는 지를 확인하기 위하여 세포내 B2의 위치 확인이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 betanodavirus의 B2 단백질의 세포내 위치를 확인하였다.

## MATERIAL AND METHOD

PCR을 수행하여 B2의 full ORF 부분을 증폭한 이후 pEGFP-N1 vector에 cloning하였다. 이와 같이 준비한 B2-pEGFP를 electroporator를 사용하여 GF cell에 transfection시킨 후 24시간째에 B2의 세포내 위치를 confocal microscopy로 확인하였다.

## RESULTS

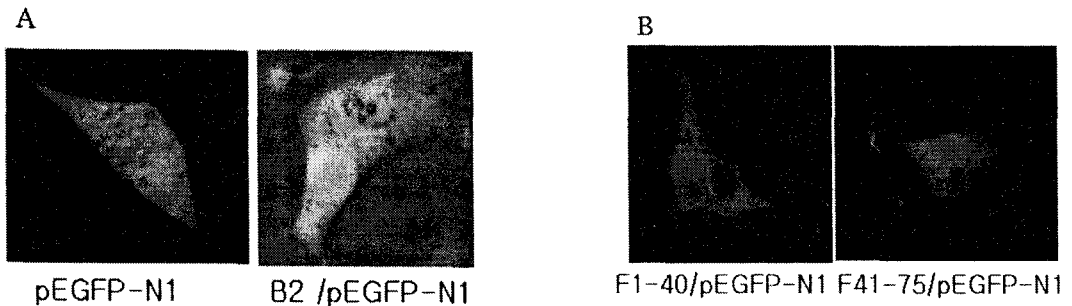


Fig. 1. Subcellular localization of B2 in GF cells.

(A) Left, empty vector; right, full-length B2 fused to EGFP. (B) Left, N-terminal half of B2 fused to EGFP; C-terminal half of B2 fused to EGFP.

B2유전자가 transfection된 GF cell를 confocal microscope로 관찰한 결과, pEGFP empty vector만 transfection된 세포의 경우 형광이 세포 전체에 퍼져 존재함이 확인 되었다. 이와 비교하였을 때, full-length B2-pEGFP로 transfection된 세포의 경우 형광이 핵과 세포질에 존재함이 관찰되었다. 다음으로 B2를 N-terminal 과 C-terminal 부분으로 나누어 세포에 transfection 시킨 결과 C-terminal 부분의 경우 full-length와 비슷하게 세포 전체에 퍼져 존재한 반면, N-terminal 부분의 경우 세포질에서만 형광이 관찰 되었다. 이후 N-terminal 및 C-terminal 부분의 fine deletion mapping 및 point mutation을 통하여 betanodavirus의 세포내 위치 결정에 관여하는 부분을 분석하였다. 이 결과는 B2의 역할을 밝히는 데에 중요한 자료를 제공하여 준다.

## REFERENCES

- Fenner BJ, Thiagarajan R., Chua HK, Kwang J., (2006). Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J. Virol.* 80: 85-94.  
Iwamoto T., Mise K., Takeda A., Okinaka Y., Mori K., Arimoto M.,

- Okuno T., Nakai T. (2005). Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *J. Gen. Virol.* 86:2807-16.
- Schneemann A., Reddy V., & Johnson JE. (1998). The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Advances in Virus Research* 50:381-446.
- Sommerset I., Nerland AH. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis. Aquat. Organ* 58:117-125.