

## 일본뇌염 바이러스 국내분리주 K94P05의 NS4 부위 분석

국립보건원 바이러스질환부 신경계바이러스과, <sup>1</sup>고려대학교 미생물학 연구실

김은정 · 남재환 · 박용근<sup>1</sup> · 조해월\*

=Abstract=

### Analysis of the NS4 Region of Japanese Encephalitis virus K94P05 Isolated from Korea

Eun-Jung Kim, Jae-Hwan Nam, Yong-Kenun Park<sup>1</sup> and Hae-Wol Cho\*

Div. of Arbovirus, Dept. of Viral Disease, National Institute of Health, Seoul 122-020, and  
<sup>1</sup>Dept. of Microbiology, Korea University, Seoul 136-075, Korea

To investigate the NS4 region of JEV, NS4 cDNA of K94P05 (JEV strain isolated from Korea in 1994) was amplified by RT-PCR and analyzed by sequencing PCR product. Genomic size of NS4 was 1212bp and nucleotide sequence was compared with that of other JEV strains. Nucleotide homology between JaOAr582 and K94P05 was 91.1% and that between Beijing and K94P05 was 89.8%, respectively. But the nucleotide sequence of E region of JaOAr582 and K94P05 showed 97.0% homology and that of Beijing and K94P05 did 95.8% homology.

NS4 protein was expressed as a form of fusion protein by a prokaryotic expression system. The induced fusion product showed a lower molecular weight than predicted size and remained insoluble. The NS4 protein might be cleaved by *E. coli* protease. Concluding above results, high hydrophobicity of the NS4 protein supported the fact that this protein played a role as a membrane component and the poor nucleotide sequence conservativity among JEV strains suggested that this region might be important to adapt each viral growth environment.

**Key Words:** Japanese encephalitis virus, NS4 gene, Thioredoxin fusion expression system

## 서 론

일본뇌염 바이러스는 flavivirus에 속하는 positive sense RNA virus이다. 염기 배열은 1987년 처음 결정되었는데 [1,2] 크기 약 11kb인 genomic RNA는 하나의 ORF로 이루어져 있으며, 바이러스 단백질들이 5'-C-prM-E-NS1-NS2a,b-NS3-NS4a,b-NS5-3'의 순서로 coding되어 있다. 바이러스에 감염된 세포에서는 genome 크기의 RNA만이 발견되었는데 이 RNA가 mRNA의 역할을 하여 한 분자의 긴 peptide로 translation되고 이 peptide가 다

시 10개의 바이러스 단백질로 processing되는 것으로 알려져 있다 [2,3]. 이중 바이러스의 구조를 형성하는 구조 단백질은 C (capsid), prM 또는 M (membrane), E (envelope) 단백질이며, 5개의 비구조 단백질이 있다. 5'말단에는 type I cap이 있으나, 3'말단에는 poly A tail이 없다. C 단백질은 크기가 14kd인 염기성 단백질로서 nucleocapsid의 구조를 이루는 성분이다. prM은 19kd의 당단백질로서 세포내의 바이러스 입자에서는 발견되지 않으므로 M 단백질의 전구체이며, M 단백질은 8kd의 소수성 단백질로 바이러스 envelope의 지질막에 묻혀 있다. Envelope의 주요 단백질인 E 단백질은 분자량이 53kd 이고 한 개의 glycosylation site를 가지고

\* Corresponding author

있는데, 이 단백질은 바이러스 입자의 조립과 세포 표면에 있는 바이러스 수용체에의 부착, 세포막 융합 등 바이러스의 생물학적 기능을 담당하고 있다 [4,5]. 비구조 단백질 NS1은 바이러스에 감염된 세포내, 세포 표면과 세포밖에 있는 모든 바이러스 입자에서 발견된다. NS2A와 NS2B 단백질은 비구조 단백질들의 processing에 관련되어 있는 것으로 보고되며 [6,7], NS3 단백질은 protease 활성과 동시에 triphosphatase/helicase 활성이 있다. NS5 단백질은 일본뇌염 바이러스 단백질중 가장 큰 단백질로서 RNA dependent RNA polymerase로 알려져 있다 [8]. 이중 NS4 단백질의 정확한 기능에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 다른 flavivirus에 대한 연구에 근거하면 NS4 단백질은 viral replication complex로 작용하거나, NS3와 NS5 단백질이 membrane상에서 정확한 위치를 차지할 수 있도록 하는 것으로 추측되고 있으나 [9], NS4 단백질의 세포내에서의 기능 및 위치는 정확히 밝혀져 있지 않다. 또한 NS4 단백질은 NS4A와 NS4B로 processing되어 기능을 하는 것으로 제시되고 있는데 NS4B 앞에 존재하는 hydrophobic한 아미노산 서열이 signal로 작용하여 RER (rough endoplasmic reticulum)에 존재하는 signal protease에 의해 cleavage되는 것으로 여겨지고 있으나 [9] 역시 증명된 바는 없다. 그리고 최근 중국에서 생백신 (live vaccine)으로 개발된 일본뇌염 바이러스주인 SA14-14-2 strain [10]에서는 wild type인 SA14 strain과 비교하여 모두 15개의 아미노산이 치환되었고 [11], 이들중 5개의 변이가 비구조 단백질에서 일어났는데 이중 1개가 NS4 위치에서 발견되고 있어 이 부위가 바이러스의 attenuation에 작용할 가능성도 있다.

따라서, 본 연구에서는 NS4 부위에 대한 분석을 위해 국내에서 분리된 일본뇌염 바이러스주인 K94P05의 NS4 부위에 대한 염기 서열을 결정하여 다른 분리주들과 비교하고, 대장균 발현 시

스템을 이용하여 발현시키고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. JE Virus 및 발현 벡터

일본뇌염 바이러스는 1994년에 국내에서 분리된 주를 사용하였다. 발현 벡터 및 숙주로는 invitrogen사에서 제작 판매하는 pTrsFus와 GI724를 사용하였다. pTRXFus는 P<sub>L</sub> promoter 조절하에 있는 thioredoxin 융합 유전자를 포함하고 있다.

### 2. RNA 분리 및 cDNA합성, RT-PCR

RNA는 Guanidine thiocyanate kit (Promega, Madison, WI)를 사용하여 분리하였다. 최종적으로 얻어지는 RNA pellet을 10 µl의 DDW에 녹여 cDNA 합성에 사용하였다. 분리한 RNA를 포함한 용액을 8µl, RT buffer (5×) 4µl, dNTP (2.5mM) 4µl, random Hexamer (50 A<sub>260</sub> Units, Boehringer Mannheim Mannheim, Germany) 1µl, DTT (0.1M) 2µl을 섞고 70℃에서 5분간 반응시키고 얼음에 급속히 넣었다. 이 반응물에 reverse transcriptase (SuperScript™ II, 200 units) 1 µl을 첨가한 후 42℃ 온도에서 30분 반응 후 95℃에서 5분간 불활화시켜 -20℃에 저장하여 사용하였다.

제조된 cDNA 2µl, mixed dNTP (2.5mM) 5µl, sense and antisense primer (20µm) 2µl, 10×PCR buffer 10µl, Taq polymerase 2.5 units (Boehringer Mannheim)에 pfu enzyme을 0.25 unit을 첨가하고 전체 양이 100µl이 되도록 증류수로 적정하였다. 이 PCR mixture를 Perkin-Elmer-Cetus thermal cycler (Model 9600 Norwalk, CT)로 (94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 3분, 30 cycles) 증폭한 후 마지막 cycle에서 충분한 polymerization time을 주기 위해 72℃에서 10분간 1 cycle을 반응하였다. 증폭이 끝난 PCR products는 ethidium bromide를 포함한 1.5% agarose gel에서 running하여 확인하였다. 사

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence	Position
EJ1	5'-AGCAGGTCTAGAATCAGCCATTGTCTTCATAGAG-3'	sense
EJIR	5'-CCCCGTCGACCTACCTTTTCAAGGAGGGCTTATC -3'	antisense
NS3R	5'-CTTCGAGAGCCCATTCTGGTGT -3'	antisense
NS4R	5'-GTTTTCTCTAGCATCCCCTGA-3	antisense
NS5	5'-GGGATCTAGAGAAAACCAAAG-3'	sense
NS6R	5'-CCATAATGAAGTGTCGCCA-3'	antisense
NS7	5'-TACATGCTCCCTGGATGGCAAG-3'	sense

용한 primer는 Table 1 에 나타내었다.

### 3. 증폭산물의 cloning

증폭된 PCR 산물을 TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 클로닝 하였으며, 이를 제한 효소 XbaI, SalI으로 double digestion하여 나오는 band 크기를 보고 insertion 여부를 확인하였다. 이를 다시 정제하여 expression vector로 clon-

ing 하였고, 효소 처리와 염기서열 분석에 의해 expression vector내로의 insertion 여부를 확인하였다. 전체 scheme은 (Fig. 1)과 같다.

### 4. Automatic sequencing

클로닝된 일본뇌염바이러스의 유전자를 분석하기 위하여 ABI PRISM 377 DNA sequencer를 사용하였다. Dye-terminator labeling 방식으로 반응하

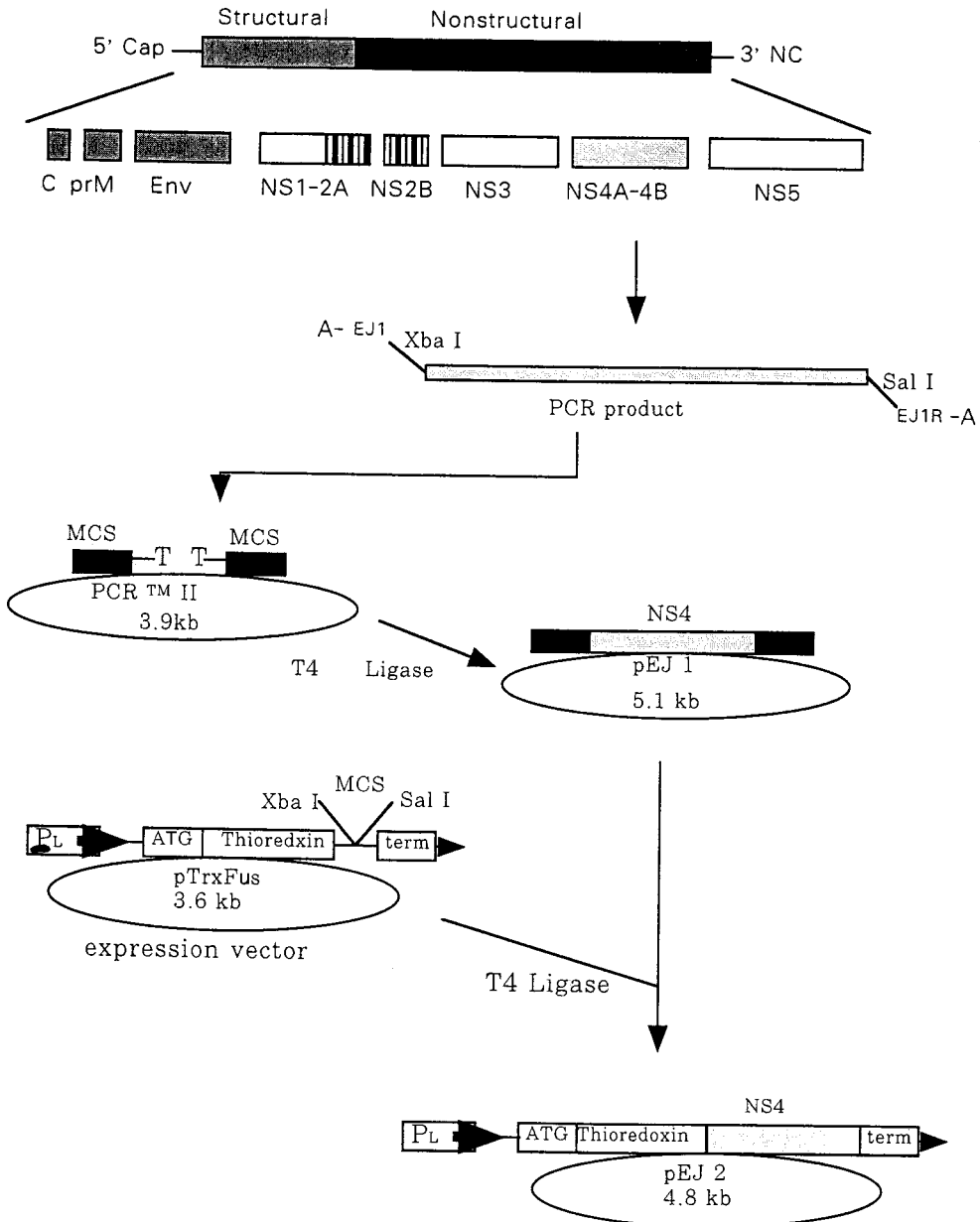


Fig. 1. Schematic diagram showing the construction of plasmid for expression.

기 위하여 클로닝된 plasmid 1 µg, oligo 3.2 pmol 1 µl, reaction mixture (Perkin Elmer) 9.5 µl을 증류수로 20 µl로 적정하여 90°C에서 20초간 1 cycle, 96°C, 10 초, 55°C 30초, 60°C 4분간 25 cycle을 반응하였다. 반응중 Centri-Sep 컬럼을 미리 DDW 750 µl를 넣어 실온에서 1시간 이상 방치하여 re-constitute 시킨 후 반응된 산물을 정제하고 염기서열을 분석하였다.

### 5. Expression

클로닝 여부가 확인된 GI 724를 RMG-AGAR 평판배지에 streaking하여 30°C에서 하룻밤 배양하였다. 18시간 후 한개의 집락을 취하여 1 ml의 RM media에서 다시 밤새 배양 하였다 (225 rpm, 30°C). 18시간 배양 후 여기서 0.5 ml을 취하여 10ml의 induction media에 넣고 A550에서의 흡광도가 0.5에 이를 때까지 배양하였다 (225 rpm, 30°C). 흡광도가 0.5에 이르면 배양액 중 1ml을 취하여 eppendorff tube에 넣고 13,000 rpm, 4°C 10분 동안 원심을 하여 상층액은 버리고 남은 pellet을 T=0 sample로 보관하였다. 발현은 남은 배양액에 최종 농도가 100µg/ml 되도록 tryptophan을 가하여 유도하여, 이후 1시간마다 위와 같은 방법으로 배양액 중에서 1 ml씩 취하여 원심시킨후 보관하는 과정을 5회 시행하였다 (T=1, 2, 3, 4, 5).

### 6. SDS-PAGE와 Western Blot

위의 과정으로 얻어진 sample에 osmotic solution을 500 µl씩 가하여 얼음에 놓고 sonicator를 이용하여 10초 간격으로 3번 sonication하고 급격히 얼렸다가 (dry ice/ethanol bath) 37°C에서 녹이는 과정을 각각 3번 반복 수행후 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심을 하였다. 이 과정에서 얻어지는 상층액과 pellet를 따로 취하여 -20°C에 두고 단백질 전기영동에 사용하였다. 상층액으로 얻어진 sample과 pellet상태로 얻어진 sample 각각에 loading dye 동량씩을 섞어 95°C에서 5분간 끓여 후 얼음위에 보관하며 loading 하였다. 전기영동은 35 mA에서 약 1 시간 동안 loading dye가 빠져 나갈때까지 시행한 다음 Western blot를 위해 NCM membrane을 얹고 50mA에서 약 2시간 동안 transfer시켰다. transfer가 끝난 NCM membrane은 blocking buffer (3% BSA in TBS)에 담그고 1시간 동안 shaking 후 TBST에 5분씩 2회 washing한후

primary antibody (anti-thio antibody 1 : 5000 dilution in TBST: thioredoxin에 대한 antibody)를 3시간 처리하였다. 이후 TBST에 5분씩 2회 washing후 secondary antibody인 goat-anti mouse alkaline phosphatase를 1 : 2000 으로 TBST에 희석하여 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST로 2회, TBS로 한차례 씻은 후 다시 Alkaline phosphatase buffer (AP buffer)로 씻어 주었다. 여기에 AP buffer 10ml당 NBT 66 µl와 BCIP 33 µl를 가하여 가볍게 흔들어 주면서 10분간 발색반응을 관찰하고 D.D.W.를 가하여 흔들어 주면서 반응을 정지 시켰다.

## 결과 및 성적

### 1. JEV gene의 cloning

K94P05의 NS4 gene을 primer EJ1과 EJ1R 사용하여 1212 bp의 산물을 확인한 후 클로닝하였다 (Fig 2).

### 2. 염기 서열의 비교

클로닝된 일본뇌염 바이러스 K94P05의 NS4부위의 염기 서열을 전체 염기 서열이 밝혀진 JaOar582 strain을 기준으로 하여 automatic sequencing으로 결정하였다.

클로닝된 균주 사이의 variation에 의한 차이를 없애고자 2개의 clone을 대상으로 sequencing하여 동일한 것을 택하였으며 서로 반대쪽 방향의 primer를 사용하여 겹치는 부분의 염기서열을 확인하였다. 염기 서열 비교에는 DNASIS program

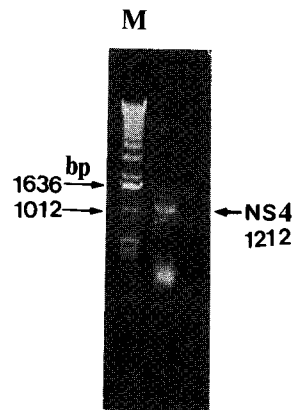


Fig. 2. Amplified K94P05 NS4 cDNA by RT-PCR M: 1 Kb ladder.

```

1                                                                 80
JaOAr   : TCAGCCATTAGCTTCATAGAGGTGCTCGGTGCGCATGCCTGAGCATTTCATGGGAAAGACGCGGGAAGCTTTAGACACCAT
K94P05  : .....A.....T.....A..
Beijing : .....G.....C.....T.....
SA14    : .....G.....
SA14,14,2: .....G.....

81                                                                 160
JaOAr   : GTACTTGGTTGCAACGGCTGAGAAAGCGGGAAAGCACACCGAATGGCTCTCGAAGAGCTGCCAGATGCACTGGAACCA
K94P05  : ..TC.....A.....T.....C.....T.....A.....C..C..T.....G.....
Beijing : .....G.....T.....T.....
SA14    : .....T.....
SA14,14,2: .....T.....

161                                                                 240
JaOAr   : TCACACTTATTGTTGCCATTACTGTGATGACAGGAGGATTCTTCTACTAATGATGCAGCGAAAGGGTATAGGGAAGATG
K94P05  : .....C..C.....C.....G..C.....
Beijing : ..T..C..C.....T.....
SA14    : .....C..C.....GA..
SA14,14,2: .....C..C.....

241                                                                 320
JaOAr   : GGTCTTGGAGCTCTGGTGCTCACGCTAGCTACCTTCTTCTGTTGGCGGCAGAGGTTCTTGGAACTAAAAATAGCAGGGAC
K94P05  : .....A..G.....A.....G..C.....T.....A.....C.....G..T..
Beijing : .....A.....C.....C.....
SA14    : .....A.....C.....
SA14,14,2: .....A.....A.....C.....

321                                                                 400
JaOAr   : CCTGCTGATCGCCCTGCTGCTGATGGTGGTCTCATCCAGAACCAGAAAAACAGAGGTCACAGACAGATAACCAACTGG
K94P05  : ..T..A.....
Beijing : A.....C.....
SA14    : .....
SA14,14,2: .....

401                                                                 480
JaOAr   : CGGTGTTTCTCATCTGCGTCTTGACCGTGGTTGGAGTGGTGGCAGCAAACGAGTACGGGATGCTAGAGAAAACCAAAGCA
K94P05  : .....
Beijing : .....T.....A.....G..A.....
SA14    : .....T.....A.....
SA14,14,2: .....T.....A.....G.....

```

Fig. 3. The comparison of nucleotide sequence of K94P05 with other JEV strains(means same nucleotide).

481 560

Ja0Ar : GATCTCAAGAGCATGTTTGTCCGAAAGACGCAGGCATCAGGGCTGACTGGATTGCCAAGCATGGCACTGGACCTGCGTCC

K94P05 : .....G.....A.....A.....C.....T.....C.....

Beijing : .....G.....C.....A.....

SA14 : .....G.....A.....

SA14, 14, 2: .....G.....A.....

561 640

Ja0Ar : AGCCACAGCCTGGGCCTGTATGGGGGAGCACAGTCGTCTAACCCTCTTCTGAAACACCTGATCACGTTCCGGAATACG

K94P05 : .....T.....G.....T.....T.....C.....TG.....A.....T.....A.....

Beijing : .....C.....T.....T.....G.....G.....

SA14 : .....G.....

SA14, 14, 2: .....G.....

641 720

Ja0Ar : TCACCACATCGCTAGCCTCAATTAACCTACAAGCTGGCTCATTATTGCTCTGCCACGAGGCGTGCCTTTTACCGACCTA

K94P05 : .....T.....TT.....C.....GT.....G.....T.....GC.....T.....T.....G.....T.....C.....T.....

Beijing : .....C.....T.....

SA14 : .....C.....

SA14, 14, 2: .....T.....

721 800

Ja0Ar : GACTTGACCSTTGGCCTCGTCTCCTTGGCTGTGGGGTCAAATCACCCCTTACAACGTTTCTGACAGCCATGGTTCTGGC

K94P05 : .....T.....T.....C.....C.....C.....C.....T.....T.....

Beijing : .....A.....

SA14 : .....G.....C.....

SA14, 14, 2: .....T.....C.....C.....

801 880

Ja0Ar : GACACTTCATTATGGGTACATGCTCCCTGGATGGCAAGCAGAAGCACTCAGGGCTGCCAGAGAAGGACAGCGGCTGGAA

K94P05 : .....C.....G.....G.....A.....T.....A.....C.....

Beijing : .....C.....C.....G.....A.....T.....

SA14 : .....C.....A.....

SA14, 14, 2: .....C.....

881 960

Ja0Ar : TAATGAAGAATGCCGTTGTTGACGGAATGGTCGCCACTGATGTGCCTGAACTGGAAAGGACCACCCCTCTGATGCAAAA

K94P05 : .....C.....A.....T.....T.....

Beijing : .....A.....T.....T.....

SA14 : .....T.....T.....

SA14, 14, 2: .....T.....T.....

Fig. 3. Continued.

```

          961                                     1040
JaOAr   : AAAGTCGGACAGGTGCTCCTCATAGGGGTAAGCGTAGCAGCGTTCTCGTCAACCCTAATGTCACCACTGTGAGAGAAGC
K94P05  : .....C..A.....C..G..G..T.....C.....C.....G..
Beijing : .....G.....G.....
SA14    : .....G.....
SA14,14,2: .....G.....CA

          1041                                     1120
JaOAr   : AGGGGTATTGTGTACGGCGGCTACGCTCACTTTGTGGGACAATGGAGCCAGTGCCGTCTGGAATCCACCACAGCCACGG
K94P05  : ..T..G.....Aig..C..A.....C.....A.....C..T...
Beijing : .....G.....T.....T.....
SA14    : .....G.....T.....T.....
SA14,14,2: .....G.....T.....T.....

          1121                                     1200
JaOAr   : GACTCTGCCATGTTATGCGAGGTAGCTACCTGGCTGGAGGTTCCATTGCTTGGACTCTCATCAAGAAGCGGATAAGCCC
K94P05  : .....C.....C.....A.....C.....T.....
Beijing : ..G.....C.....T..C.....
SA14    : .....C.....C.....T.....
SA14,14,2: .....C.....C.....

          1201         1212
JaOAr   : TCCTTGAAAAGG
K94P05  : .....
Beijing : .....
SA14    : .....
SA14,14,2: .....

```

Fig. 3. Continued.

을 이용하였다. 비교 결과 JaOAr strain과 K94P05 strain을 비교시 총 1212개의 염기중 105개가 변화하여 8.66%의 변이율을 보였고, 이중 19개가 transversion되었다. Beijing strain과 비교시 K94P05 염기중 124개가 변화되어 10.23%의 변이율을 보였으며, 이중 20개가 transversion되었다 (Fig. 3).

### 3. 아미노산 서열 분석

정해진 염기서열에 기초하여 PROSIS 프로그램을 이용하여 아미노산 서열을 다른 바이러스주와 아미노산 서열을 비교해 보았다. JaOAr582 strain과 비교시 K94P05 strain의 아미노산 변이는 총 404개의 아미노산중 12개로 2.97%의 변이

율을 보였고 Beijing strain과는 16개의 아미노산 차이로 4.21%의 변이율을 보였다 (Fig. 4).

### 4. 발현된 단백질의 분석

Expression vector인 pTrxfus는 multicloning site에 외부 유전자가 도입될 때 thioredoxin이라는 *E. coli* 단백질과 fusion protein을 생성하게 한다. 일본뇌염 바이러스의 NS4 유전자를 클로닝후 insertion여부는 제한효소를 처리하여 나오는 산물의 크기를 비교 함과 동시에 염기서열 분석을 통하여 중간에 종결코돈 (stop codon)이 생성되었는지의 여부와 정확한 위치로의 insertion 여부를 확인하였다. Thioredoxin의 분자량은 약 12kDa이고 일본뇌염 NS4 단백질은 43kDa의 분자량을 가지

1 80  
 Ja0Ar : SAISFIEVLGRMPEHFMGKTREALDTMYLVATAEKGKKAHRMALEELPDALETITLIVAITVMTGGFFLLMMQRKGIGKM  
 K94P05 : .....G.....G.....  
 Beijing : ..V.....  
 SA14 : ..V.....R.  
 SA14, 14, 2: ..V.....T.....

81 160  
 Ja0Ar : GLGALVLTLATFFLWAAEVPGTKIAGTLLIALLLMVVLIPEPEKQRSQTDNQLAVFLICVLTVVGVVAANEYGMLEKTKA  
 K94P05 : .....G.....  
 Beijing : .....M.....  
 SA14 : .....  
 SA14, 14, 2: ..P.....

161 240  
 Ja0Ar : DLKSMFVGKTQASGLTGLPSMALDLRPATAWALYGGSTVVLTPLLKHLITSEYVTTSLASINSQAGSLFVLPRGVPFDDL  
 K94P05 : .....R.....R.....M.....V.....S.....S.....  
 Beijing : .....G.....P.....  
 SA14 : .....G.....  
 SA14, 14, 2: .....G.....

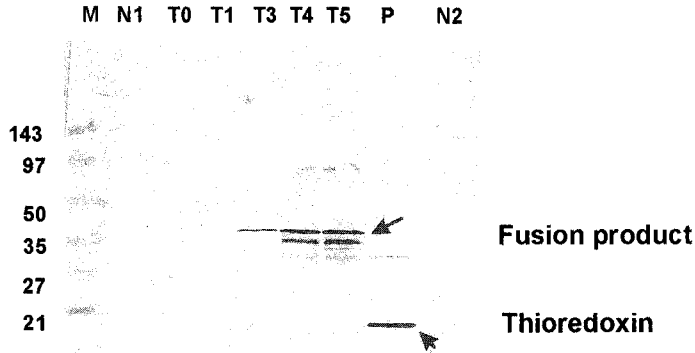
241 320  
 Ja0Ar : DLTVGLVFLGCVGGQITLTTFLTAMVLATLHYGYMLPGWQAEALRAAQRRTAAGIMKNAVVDDGMVATDVPELERTTPLMQK  
 K94P05 : .....F.....V.....  
 Beijing : .....I.....  
 SA14 : .....V.....  
 SA14, 14, 2: .....L.....

321 400  
 Ja0Ar : KVGQVLLIGSVAAFLVNPVTTVREAGVLVTAATLTLWDNGASACWNSTTATGLCHVMRGSYLAGGSIWTLIKNADKP  
 K94P05 : .....R.....  
 Beijing : .....  
 SA14 : .....  
 SA14, 14, 2: .....Q.....

404  
 Ja0Ar : SLKR  
 K94P05 : ....  
 Beijing : ....  
 SA14 : ....  
 SA14, 14, 2: ....

Fig. 4. Comparison of deduced amino acid sequences between K94P05 and other JEV strains.





**Fig. 5.** Western blot of expression product M :marker, N1: Negative control ( $\Delta$  Tryptophan), T0: Time 0 sample (no induction), T1~T5: Induced fusion product, P: Positive control ( $\Delta$  NS4 gene), N2: Negative control ( $\Delta$  TrxA gene).

므로 예상되는 발현 산물의 분자량은 약 55KDa 이다. 그러나 예상보다 적은 분자량을 가진 단백질이 발현되었다. 하지만 이 때가 thioredoxin에 대한 단일 항체와 반응을 하여 시간에 따라 그 양이 증가 하는 것으로 보아 발현이 유도되고 있음을 확인하였다 (Fig. 5).

## 고 찰

Flavivirus를 통틀어 비구조 단백질인 NS4 단백질에 대해서는 연구된 바가 거의 없고 일본뇌염 바이러스의 경우 염기 서열이 밝혀진 주 (strain)도 많지 않다. 이 논문에서는 NS4 부위의 분석을 위한 첫 단계로 국내 분리주인 K94P05 NS4 부위의 유전자를 클로닝하여 염기서열을 결정하였고 다른 분리주와 비교하여 보았다. 염기서열 분석 결과 국내 분리주 K94P05의 NS4의 염기는 JaOAr582주 (1982년 모기에서 분리, 일본)와 비교시 총 염기 1212개중 105개가 변하여 91.1%의 유사성 (homology)을 보였고, Beijing주 (1949년 사람뇌에서 분리, 중국)와는 124개의 염기가 변화하여 89.8%의 유사성이 있었다. JaOAr582주와 Beijing주 사이의 homology는 96.1%였다. 염기의 변화는 세 바이러스주들간의 지역적 차이 및 시간적 경과에 기인한 것이라 생각해 볼 수 있다. 하지만 같은 해 분리된 바이러스의 E 유전자 부위에 대한 염기서열 분석[14,15]에서는 Beijing주와는 96.8%, JaOAr582주와는 97.4%의 높은 homology를 보였으므로 이 NS4 부위가 특별히 돌연변이에 민감한 부분이라 생각된다. 염기 서열에는 많은 변화가 있었으나 아미노산으로 치환되

었을 때에는 각각 JaOAr582주와는 97.0%, Beijing주와는 95.8%의 높은 homology를 보여 염기 변화가 대부분 3rd codon 위치에 일어났음을 알 수 있었다. 세 바이러스주간 항원성 차이는 없으므로 알려져 있어 [15] 이런 변화가 바이러스의 면역학적 기능에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. 이런 점으로 미루어 볼때 이 NS4 부위는 환경에 적응하는 과정에서 변이가 잘 일어나는 것으로 생각되며 반면 단백질의 전체적인 구조에는 큰 변화가 없으므로 이 부분의 염기 변이는 일본뇌염 바이러스의 codon usage 영역을 넓히는 데 기여하는 것 같다.

NS4 단백질의 실제 기능을 확인하여 보고자 염기서열을 분석하여 중간에 종결코돈 생성 여부를 확인후 발현을 시도하였는데 발현에 사용한 vector pTrxfus가 많은 hydrophobic한 단백질에 solubility를 부여하는 장점이 있어 정제에 편의를 도모하고자 사용한 것이었으나, 발현 산물이 너무 hydrophobic하여서인지 *E.coli* 상층액으로 분리되지는 않았고, 또한 cDNA insert size에 근거해서 예상할 수 있는 것보다 작은 분자량을 가진 단백질이 발현됨을 관찰할 수 있었다. 이것은 incomplete translation이나 proteolytic degradation 결과일 것이다 [16]. 하지만 sequencing 결과 mutation에 의해 종결코돈이 생성되지 않았음을 확인하였기 때문에 발현된 산물이 *E.coli* protease에 의해 cleavage되는 것이라 여겨지며, fusion protein 발현량이 적은 것도 foreign hydrophobic sequence의 도입이 *E.coli*에 toxic할수 있기 때문인 것 같다. 다른 flavivirus 에 대한 연구를 참고할때 NS4 region 내부에는 보존성이 높은 hydrophobic

아미노산 서열이 존재하며 이것이 signal이 되어 host의 endoplasmic reticulum에 있는 signal peptidase에 의해 NS4A와 NS4B로 cleavage된다고 한다. 일본뇌염 바이러스인 K94P05에서도 이런 signal sequence가 존재함을 아미노산 서열 분석으로부터 확인하였으나 이 부분에서의 cleavage는 일어나지 않은 것으로 보인다.

이상의 실험에서는 일본뇌염 바이러스의 NS4 부위의 염기 서열을 결정하였고 이 부위의 변이가 심하나 전체 단백질의 구조에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으며 아미노산 서열 분석 결과를 토대로 hydrophobicity를 조사해 본 결과 소수성이 매우 강하여 아마도 membrane spanning domain을 이룰 것이라는 짐작을 해볼 수 있었다. 또한, 이 NS4 단백질이 NS3, NS5 단백질과 함께 replication complex를 이루고 두 단백질의 정확한 localization에 영향을 미칠 수 있는 가능성을 가지고 있다는 보고가 있으므로 이 부위에 누적된 돌연변이가 바이러스의 복제 능력에 변화를 주어 바이러스의 attenuation에 관여 할 수도 있을 것이다. 하지만 이런 모든 가능성의 증명을 위해서는 우선 NS4 단백질을 *in vitro* 상에서 얻어 기능을 밝히는 것이 선행되어야 할 것이며 이를 위해서는 알맞는 발현 system 선정이 필요하리라 생각된다.

## 결 론

이 논문에서는 국내에서 분리된 일본뇌염 바이러스로부터 일반적으로 일본뇌염 바이러스의 10개의 단백질 중 그 기능이 밝혀진 바가 적은 NS4 부위에 대해 알아보려고 하였다. 이를 위해 일단 일본뇌염의 NS4 부위를 PCR에 의해 증폭시킨 후, cloning 하여 염기서열을 분석 (sequencing) 하여 다른 바이러스주들간의 변이의 정도를 비교해 보았다. 그 결과 국내 분리주 K94P05의 NS4의 염기는 JaOAr582주 (1982년 일본)와 비교시 총 염기 1212개중 105개가 변하여 91.1%의 유사성 (homology)을 보였고, Beijing주 (1949년 중국)와는 124개의 염기가 변화하여 89.8%의 유사성이 있었다. JaOAr582주와 Beijing주 사이의 homology는 96.1%였다. 이 부위의 염기수는 총 1212개이며 결정된 염기 서열로부터 PROSIS 프로그램을 이용하여 아미노산 서열 분석 결과 아미노산 서열 homology는 K94P05와 JaOAr582주간 97.4%,

K94P05와 Beijing주사이 96.8%로 높아 전체 단백질의 구조에는 변화가 없었다. 이런 결과는 NS4 부위의 염기 보존성이 낮은 반면 단백질의 전체 구조에는 큰 영향을 끼치지 못함과 이 단백질이 매우 hydrophobic함을 보여 주었다. *E. coli*에서의 유도발현 실험에서는 thioredoxin이라는 단백질과 fusion protein을 형성하게 하는 expression vector pTrxfus를 이용하였다. 이 vector의 장점은 fusion product에 solubility를 부여하여 발현 산물의 정제를 쉽게 해 준다는 것인데 유도된 산물은 여전히 *E. coli* 내부에 존재하며 외부로 나오지 않았고, 예상보다 작은 분자량을 가진 단백질이 소량 발현됨을 확인할 수 있었는데 이것은 *E. coli* 발현 system을 사용했기 때문에 hydrophobic한 일본뇌염 바이러스의 NS4 단백질이 *E. coli*에 toxic하게 작용하였고 또한 *E. coli*가 가지고 있는 protease 의해 cleavage되는 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 일본뇌염 바이러스의 NS4부위가 보존성이 매우 낮으며 소수성이 강해 환경에 적응하는 과정에서 많은 염기 변이가 생기는 변이에 민감한 부위이며, 이 단백질의 대부분이 membrane spanning domain으로 작용할 것이라는 결론을 얻을 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Mcada PC, Mason PW, Schmalijohn CS, Dalrymple JM, Mason TL and Fourmier MJ: Partial nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome. *Virology* 158: 348-360, 1987.
2. Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, Morita K, Kuhara S, Kondou J, Kikuchi Y, Nagamatu H and Igarashi A: complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* 161: 497-510, 1987.
3. Hasegawa H, Yoshida M, Fujita S and Kobayashi Y: Comparison of structural proteins among antigenetically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* 12:841-844, 1994.
4. Heinz, EX: Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in Virus Research* 31: 103-168, 1986.
5. Anderson, R, King, AD, Innis, BL: Correlation

- of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *Journal of General Virology* 73: 2155-2159, 1992.
6. Lei-Ron Jan, Czau-Siung Yang, Dennis W. Trent, Barry Falgout and C.J.Lai: Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *J Gen Virol* 76: 573-580, 1995.
  7. Chao L, Sean MA, Thomas JC and Charles MR: Cleavage at a Novel Site in the NS4A Region by the Yellow Fever Virus NS2B-3 Proteinase is a Prerequisite for Processing at the Downstream 4A/4B Signalase Site. *J Virol* 2327-2335, 1993.
  8. Tsutomu T, Daitoku S and Toru F: Japanese Encephalitis Virus Nonstructural protein NS3 Has RNA Binding and ATPase Activities. *Virus Genes* 9: 105 -112, 1994.
  9. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R and Rice CM: Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688, 1990.
  10. Haolin N, Gwong-Jen J. Chang HX, Dennis WT and Alan DTB: Molecular basis of attenuation of neurovirulence of wild type Japanese Encephalitis virus strain SA14. *J Gen Virol* 76: 409-413, 1995.
  11. Eckels KH, Yu YX, Dubois DR, Marchette NJ, Trent DW and Johnson AJ: Japanese encephalitis virus live-attenuated vaccine, chinese strain SA sub (14)-14-2; adaptation to primary canine kidney cell cultures and preparation of a vaccine for human use. *Vaccine* 6: 513-518, 1988.
  12. Smith DA and Inglis SC: The mutation rate and variability of eucaryotic viruses; an analytical review. *J Gen Virol* 68: 2727-2740, 1987.
  13. Steinhaur DA and Holland JJ: rapid evolution of RNA viruses. *Ann Rev Microbiol* 41: 409-433, 1987.
  14. Chung YJ, Nam JH, Ban SJ and Cho HW: Antigenic and genetic analysis of Japanese Encephalitis Virus isolated from Korea. *Am J Trop Med Hyg* 55: 91-97, 1996.
  15. Cho, Hae W, Nam, Jae H, Lee, You J, Kim, Eung J, Lee, Hong D, and Koh, Hyun C: Antigenic and genetic differences between the prototype Nakayama-NIH strain and Korean strains of Japanese encephalitis virus. *J. Kor. Soc. Virol.* 26: 191-204, 1996.
  16. Mason PW, Mcada PC, Dalrymple JM, Fourier MJ and Mason TL: Expression of Japanese Encephalitis Virus Antigens in *Escherichia coli*. *J Virol*: 361-372, 1987.
-