

한국형 사람 Caliciviruses의 RNA-Dependent RNA Polymerase Diversity

¹서강대학교 생명과학과, 한양의대 미생물학교실

한동표¹ · 김지애 · 양재명¹ · 김경희

=Abstract=

Human Caliciviruses in Korea: A New Prevalent Group Defined by RNA-Dependent RNA Polymerase Diversity

Dong-Pyo Han¹, Ji-Aee Kim, Jai-Myung Yang¹ and Kyung-Hee Kim

¹Dept. of Life Science, Sogang Univ., Seoul 121-742, and Dept. of Microbiology, Hanyang Univ. College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

Human caliciviruses (HuCVs) cause sporadic cases and outbreaks of acute gastroenteritis (AGE). Three major genogroups of HuCVs have been described including the Norwalk virus (NV)-, the Snow Mountain virus (SMA)-, and the Sapporo-genogroups. This study describes the detection and genetic variation of HuCVs from hospitalized infants with AGE in Korea by RT-PCR and sequencing. The cDNA fragments of 206 to 470bp corresponding to the region of 3 primer pairs (36/35, 35/51 or 3/51) in the polymerase region of NV were generated. Of 185 stools screened, 8% were positive by RT-PCR and their sequences showed that all strains contained the GLPSG and YGDD motifs which are conserved for HuCVs. Amino acid (aa) sequence analysis showed that these strains can be divided into 3 major genogroups. High conservation was observed in that one strain shares 100% of aa sequence with Southampton virus, another shares 99% with the Sapporo virus, and six strains share 90 to 95% with Snow Mountain virus. However, significant sequence variation was also found in other strains. This study indicates that all major genogroups of HuCVs are circulating in Korea.

Key Word: Caliciviruses, RNA polymerase, Genetic diversity

서 론

Caliciviridae에 속하는 '사람 caliciviruses (HuCVs)'는 직경 ~35 nm 가량되는 정20면체 내에 7.6 kb의 한줄짜리 RNA 지놈을 가진 조그마한 바이러스로 최근 지구 곳곳의 소아군에서 산발적/유행성 급성장염의 원인체로 자주 거론되고 있다 [1]. 그러나 대부분 환자 회복기 혈청을 사용하는 면역전자현미경으로 처음 발견되는 이들 바이러스 본 연구는 95년도 교육부 기초의학 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

들의 항원성이 매우 다양하여, 이들이 분리되었던 국외에서는 지놈서열 분석을 통한 dendrogram 규명이 활발히 이루어지고 있다.

1968년 미국 오하이오주 Norwalk시에 대유행 하였던 급성 장염 발발때 채취, 보관되었던 변검체의 전자현미경적 관찰에서 처음 발견되었던 prototype Norwalk virus (NV) [2]를 시작으로 형태학적으로 유사한 Hawaii agent [3], Montgomery County agent [4], Taunton agent [5], Southampton virus (SHV) [6], Minireovirus [7], 아직 命名되지

않은 몇개의 혈청형 [8,9] 등이 세계 곳곳에서 폭발적인 장염 유발체로 보고되고 있다. 최근 서울에서도 유행성 급성 장염이 발발된 종합병원 신생아실에서의 영유아군 및 소아군의 산발적인 장염 변 검체에서 HuCVs가 관찰되고 있다 [10].

HuCV 지놈은 3개의 open reading frame (ORF)을 표지하는데 (그림 1A) ORF1은 RNA-dependent RNA polymerase와 같은 nonstructural protein을 만들고, ORF2는 viral capsid protein을 만들며, ORF3의 기능은 아직 규명되지 않았다 [11-13].

원인을 밝히지 못한 폭발적인 또는 산발적인 급성장염 발발로 어려움이 많은 국내에서 오염된 물이나 어패류등의 음식을 감염원으로 하는 HuCV가 많을 것은 예상이 되어 왔다. 그러나 이 바이러스가 세포배양에 자라지 않아 대량생산이 어려웠던 관계로 실용적인 진단 시약이 개발되지 못하였고, 감염자의 급성 및 회복기 혈청을 사용한 면역 전자현미경으로 관찰하거나, 분자생물학적 방법에 의존하는 상황이었다. Jiang등 [14]은 NV capsid gene을 집어넣은 recombinant baculovirus (rbaculovirus)로 감염된 곤충세포에서 virus-like particle (rNV)을 대량으로 만드는데 성공하여 'rNV' 또는 'rNV로 면역된 토끼혈청'을 coating antigen으로 하여 'NV 및 항원적으로 상호교차하는 바이러스들'이나 '이들에 대한 항체'를 탐지할 수 있는 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)이 개발되었다 [15].

원인규명이 불가능하였던 국내 변검체 및 전자현미경에 의하여 형태학적으로 HuCV로 추정되었던 검체들을 대상으로 HuCV 지놈의 3개의 ORF중 여러지역 분리주들간 유사성이 가장 많은 부분인 곳으로 알려진 RNA polymerase region 중에서 선택된 NV primer set [16]을 사용하여 RT-PCR을 시도하였는데 검사된 국내 분리주들 모두가 p36/p35이 나타내는 470bp 크기의 띠는 나타내지 않았으나, p36/p35 안쪽에서 선택된 p36/p51 (404bp)과 동일한 띠를 나타내었다. 즉, NV의 RNA polymerase region내의 470bp 중 400bp 정도 유사한 HuCV들이 국내에 존재한다는 의미였다. 따라서 본 연구의 목적은 1) 국내에 출현하는 HuCV를 RT-PCR을 사용하여 규명하고, 2) PCR 산물의 cloning/sequencing으로 국내분리주들의 지놈 다변형성을 규명하고 3) 국외주들과도 비교하여 국내 분리주들의 세계적 분류의 자료를 제공하는 것이었다.

재료 및 방법

1. 연구대상

HuCV가 전자현미경으로 탐지되었던 outbreak에 연관된 환자들 중 변 및/또는 혈청이 남아있는 환자들 및 1990-93년 3년 동안 바이러스성 산발적 장염/설사로 서울 종합병원에 입원한 소아 환자들을 대상으로 하였다.

ORF1 2C에서 p78/p80을, 3D에서 p36/p35, p36/p51, p3/p51을, ORF2에서 p42/p55, p76/p77, p64/p75를, ORF3에서 pJ1/pJ2를 선택/사용하여 RT-PCR하였다. 이들의 RT-PCR 산물을 클론하여 염기서열을 상호비교한 후 국외 분리주들과의 유전적 관계를 밝혔다.

2. 변 검체에서의 caliciviral RNA 직접 분리정제

변 검체를 증류수로 10-30%로 희석하여 4°C에서 일주야 보관한 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액속의 지방 및 불수용성 물질을 제거하기 위하여, 300 µl의 상층액을 동량의 trichlorotrifluoroethane (Genetron 113; Allied Chemical Corp., Morristown, NJ)과 진탕혼합하여 다시 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 300 µl를 동량의 2X polyethylene glycol-8000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)과 진탕혼합 후 4°C에서 30분 이상 방치한 후 15분간 원심분리하여 沈査 (pelleting)하였다. 여기에 시작 volume의 반 (150 µl)의 증류수를 넣고 15초간 진탕한 후 2X proteinase K 용액 (0.2 M Tris-Cl, pH 7.5 + 25 mM EDTA + 0.3 M NaCl + 2% SDS) 150 µl와 10 mg/ml의 proteinase K (BRL, Grand Island, NY) 12 µl를 넣어 10초간 진탕하고 37°C에서 30분 방치하였다. 여기에 10% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (Sigma) 50 µl 와 4 M NaCl 50 µl를 첨가하여 진탕한 후 56°C에서 30분 방치하였다. 이를 동량의 phenol-chloroform으로 1회, chloroform으로 1회 추출하여 2.5 volume의 ethanol과 sodium acetate (최종농도 0.3 M, pH 5.2)와 섞어 -20°C에서 일주야 보관하여 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전된 RNA 를 25 µl의 멸균된 증류수로 56°C에서 10분간 녹여 RT-PCR 및 sequencing에 사용하였다 [10,15].

3. Primers

HuCVs 사이의 지놈 서열 유사도가 매우 다양하여 아직 consensus region을 구하지 못한 상태라 9 종류의 primer set들 (그림 1)을 동시 사용하였다. 사용된 NV primer sequence들은 지놈 ORF 1의 2C helicase region, 3D RNA polymerase region, ORF2의 capsid region 및 ORF3에서 선택하고 그 배열은 표1과 같다. Primers 35/36은 Norwalk virus의 RNA polymerase region에서 선택되었고 [15], primers 51/36, 51/3은 p36/p35 안에서 선택하였으며 primers 78/80은 ORF1의 2C region에서, primers 42/55, 76/77, 64/75는 ORF2에서, primers J1/J2는 ORF3에서 선택하였다.

4. cDNA합성, 증폭 및 전기영동에 의한 RT-PCR 산물 확인

cDNA 합성 및 증폭과정 (10,16)은 10X PCR buffer 1.5 μ l, 5 mM dNTPs 2 μ l, avian myeloblastosis virus ribonuclease inhibitor (40 μ g/ μ l) 0.5 μ l, reverse transcriptase (20 μ g/ μ l) 0.25 μ l, 첫번째 primer (20 μ g/ μ l) 2.5 μ l, 증류수 5.75 μ l를 포함하는 12.5 μ l의 master mix에 위에서 정제된 viral RNA 2.5 μ l를 첨가하여 42°C에서 60분간 방치한 후 이에 PCR-master mix 35 μ l (10X PCR buffer 3.5 μ l + 두번째 primer 4 [20 ng/ μ l] 2.5 μ l + *Taq* polymerase [5 units/ μ l, Promega Biotech., Madison, WI] 0.25 μ l + 증류수 28.5 μ l)를 다시 첨가하였다. 합

성된 cDNA를 주형 (template)으로 하여 denaturation은 94°C에서 1분간, annealing은 55°C에서 2분, extension은 72°C에서 3분간 35회 PCR을 수행하였다. 그 후, 증폭산물 10 μ l를 2% nusieve agarose에 전기영동하여 RNA 띠들 (p36/p35, 470bp; p36/p51, 404bp; p3/p51, 206bp; p78/p80, 289bp; pJ1/pJ2, 670bp; p42/p55, 149bp; p76/p77, 237bp; p64/p75, 352bp)을 확인하였다 (그림 1). 멸균된 증류수를 음성대조 가검물로 매번 포함시켰다.

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Primer name	Primer sequences, 5' to 3'
35	CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT
36	ATAAAAGTTGGCATGAACA
51	GTTGACACAATCTCATCATC
3	GCACCATCTGAGATGGATGT
78	GGGCCCCCTGGTATAGGTAA
80	TGGTGACTATAGGATCAGACA AAA
42	AGTTTGTTTCCCCATCTTAATCCTTT
55	TCAACCAAAAACCCAGGGGG
76	TAGTGGCATGGGTATTTC
77	TATGCAATCACAGCCAC
64	GTCTGGCTCCCAAGTTGACC
75	CGGTATCAGGGTCAACAT
J1	AGATTTTATCAATTAAGCCTGTGG
J2	GGCAATCTATCTGTATTGAAATA

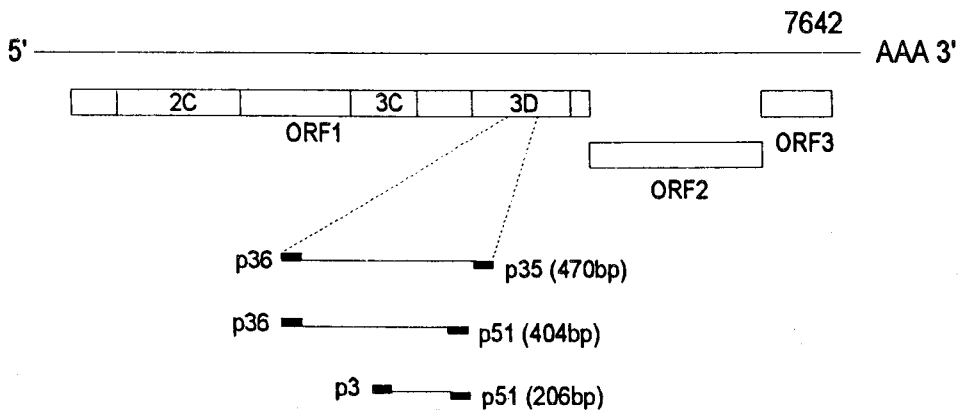


Fig. 1. Norwalk virus genome and locations of 3 primer sets. The positions of the 3 primer pairs are indicated in base pairs. The Norwalk virus sequence has a total of 7,642 nucleotides. Three open reading frames (ORF) are predicted in the sequence: ORF1 encodes a polyprotein precursor to nonstructural proteins, 2C helicase, 3C protease, and 3D RNA-dependent RNA polymerase. ORF2 encodes a viral capsid protein). ORF3 could encode a small polypeptide of 22.5K with no known function [11-14].

5. RT-PCR 산물의 클로닝과 염기서열 분석

위의 2-4 항에서 증폭된 PCR 산물을 Amersham (Buckinghamshire England)의 pMOSBlue T-vector에 봉합시켜 봉합된 plasmid (ligated PCR: pMOSBlue-T vector)를 competent cell에 transform 시켰다 (제조회사의 방법에 따름). 클론 각각들 (LB/Amp/IPTG/X-Gal 평판배지의 흰색 집락)을 LB broth 각각에 37°C에서 일주야 배양 후 plasmid DNA를 miniprepation하여 제한효소 *Hind*III 및 *Eco*RI으로 잘라 전기영동으로 확인하였다 (그림 2). 배열순서 규명은 [³⁵S]deoxyadenosine 5'-[alpha-thio]triphosphate (Amersham)과 sequencing kit (Sequenase version 2.0, USB Corp, Cleveland, OH)를 사용하여 Sanger dideoxy nucleotide chain termination 방법에 의하였다. 배열순서 규명은 6% polyacrylamide-6 M urea 겔 (TBE buffer, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)에서 수행하였고 겔

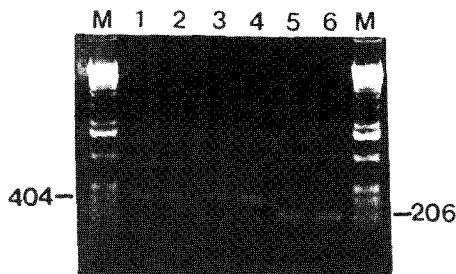


Fig. 2. RT-PCR of stools of Korean children infected with huCVs with the two primer sets, p36/p51 (404bp) and p3/p51 (206bp), yielded 404bp (lanes 1 thru 4) and 206bp (lanes 5 and 6) respectively.

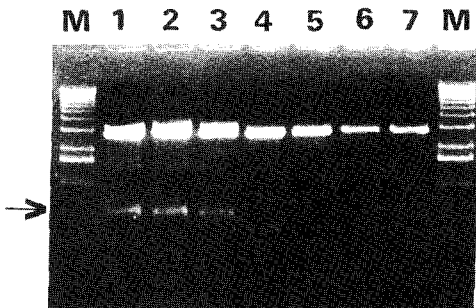


Fig. 3. Gel electrophoresis of recombinant plasmids. DNA fragments are released from pMOS-Blue T-vector by restriction enzymes *Eco*RI and *Hind*III. Lane M represents 1 kb ladder. Lanes 1 thru 7 are recombinant plasmids: 1, 2, and 3; p35/p36, 5 and 7; p3/p51.

은 진공건조시킨 후 x-ray film에 12시간 이상 노출시켰다. 클론된 바이러스 cDNA의 배열순서 분석은 PC/GENE software, version 6.60 (IntelliGenetics, Mountain View, CA)에 의하였다. 분리주들의 유전적 연관성의 분석 및 dendrogram작성은 Phylip (Phylogeny Inference Package version 3.4)을 사용하였다.

결과 및 성적

1. 국내 소아장염환자의 변 검체에서 RT-PCR에 의한 HuCVs 탐지

국내 소아장염 환자의 변검체로부터 추출한 RNA를 주형 (template)으로 하고 NV (NV8F11a/68/US)의 cDNA 염기서열을 바탕으로 제작한 3개의 primer pair들 (p36/p35, p36/p51, p3/p51)을 사용하여 RT-PCR를 수행한 결과, 206-470 bp의 cDNA 단편들이 합성되어짐을 아가로스겔 전기영동을 통하여 확인하였다 (그림 2). 총 검사한 185개의

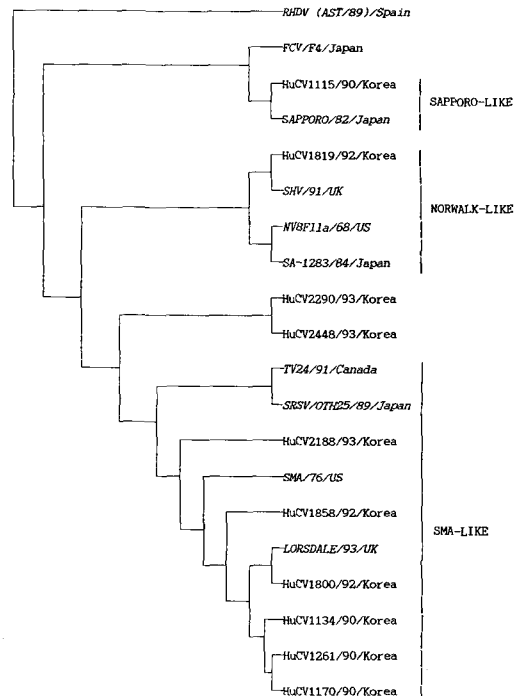


Fig. 4. Dendrogram of predicted genetic relationships among the different HuCVs and animal caliciviruses by comparison of the RNA-dependent RNA polymerase regions. The regions including amino acids 1451-1577 of ORF1 of Norwalk virus were compared using the Phylip (Phylogeny Inference package version 3.5c) program.

Table 2. Relationships of Sequences of the RNA Polymerase Region among Human and Animal Caliciviruses^a

	1170	1261	1134	<i>LORS</i>	1858	1800	2188	2290	2448	<i>SHV</i>	1819	<i>NV</i>	1115	<i>Sapporo F4</i>	
HuCV1170/90/Korea		99	99	84	82	84	79	73	73	65	70	64	53	53	47
HuCV1261/90/Korea	99		99	84	82	85	79	73	73	65	69	64	54	54	47
HuCV1134/90/Korea	99	99		84	81	84	78	73	73	65	69	64	54	52	48
<i>LORSDALE/93/UK</i>	96	95	95		90	87	80	72	72	64	67	63	49	51	50
HuCV1858/92/Korea ^b	94	93	93	97		84	79	70	71	68	71	70	49	49	52
HuCV1800/92/Korea	96	96	96	97	90		87	74	75	63	67	63	53	52	52
HuCV2188/93/Korea	91	90	90	91	90	93		73	73	65	68	64	53	52	52
HuCV2290/93/Korea	79	78	79	78	78	81	80		80	68	73	66	52	53	52
HuCV2448/93/Korea	80	79	80	78	77	81	79	91		65	67	69	54	50	49
<i>SHV/91/UK</i>	65	64	64	65	79	66	66	67	65		96	79	55	50	49
HuCV1819/92/Korea ^b	77	75	75	77	79	74	74	74	71	100		81	50	50	51
<i>NV8FIIa/68/US</i>	62	61	62	62	75	63	63	67	65	93	96		53	53	51
HuCV1115/90/Korea ^c	37	37	36	39	34	38	41	34	34	33	37	32		91	56
<i>SAPPORO/82/Japan</i>	37	37	36	38	35	37	40	32	34	34	35	33	99		57
<i>FCV/F4/Japan</i>	34	31	34	34	37	34	34	26	31	28	35	30	46	48	

Note. ^a The amino acids 1444 - 1577 of the polymerase region of ORF1 of NV-8FIIa were compared with similar sequences among the indicated pairs of virus strains. The numbers in the upper triangle show the percent similarity of the aligned nucleic acid sequences. The numbers in the lower triangle show the percent similarity of the aligned amino acids. Sequences of viruses shown in italics were obtained from EMBL/GenBank Data Libraries; Accession numbers: *Lorsdale/93/UK*, X86557; *SHV/91/UK*, L07418; *NV8FIIa/68/US*, M87661; *Sapporo/82/J* (7); *FCV/F4/J*, D31836.

^b 68 residues (132 residues) from the amino acids 1510 -1577 (1446-1577) of the polymerase region were compared.

변 검체들 중 15개 (8%)가 RT-PCR에서 양성이었다.

NV의 RNA polymerase region에서 선택된 primer를 사용한 RT-PCR에서 양성반응을 나타낸 검체들이 ORF2의 capsid region에서 선택된 primer들 (42/55, 76/77, 64/75)이나 ORF3 지역에서 선택된 primer (J1/J2)을 사용한 RT-PCR에서 반응하지 않는 것으로 볼때 국내에는 NV의 capsid 부분과 염기배열이 매우 다른 분리주들이 존재하는 것으로 해석되었다.

2. 국내 HuCVs ORF1^{pol}의 클로닝 및 염기/아미노산 서열규명

15개의 RT-PCR 산물들을 클론한 뒤 염기서열을 결정하고 이를 컴퓨터로 분석하였다. 다른 HuCVs와 마찬가지로 positive-strand RNA virus의 RNA polymerase region에 공통되는 GLPSG와 YGDD 아미노산 motif가 관찰된 검체는 206bp 이상의 산물을 보인 11개의 검체들이었다. 분석된

국내분리주중 HuCV1170/90/Korea, HuCV1261/90/Korea, HuCV1134/90/Korea의 염기/아미노산 서열의 homology가 각각 서로 99%로 이들은 동일주로 판명되었는데 *Lorsdale virus* (SMA 유전자군)와 84% 및 95-96%의 염기 및 아미노산 서열을 공유하는 높은 상동성이 관찰되었다 (Table 1). HuCV1800/92/Korea 및 HuCV1858/92/Korea도 역시 SMA 유전자군으로 판명되었다. HuCV1819/92/Korea는 국의 prototype HuCVs 지놈과 비교 분석한 결과 SHA와 96% 및 100%의 염기 및 아미노산 서열을 공유하여 NV 유전자군으로 판명되었다. 더욱 흥미로운 발견은 사람주보다는 동물주와 유사한 지놈을 소유한 *Sapporo virus*와 91% 및 99%의 염기 및 아미노산 서열 유사도를 가진 국내주 (HuCV1115/90/Korea)가 국내에서도 탐지된 점이다.

또한, 염기서열의 변이가 높은 분리주 (HuCV2188/93/Korea와 HuCV2290/93/Korea)도 발견되었는데 NV와의 염기 및 아미노산 유사도가 각각

66-69%와 63-67%였으며, Lorsdale virus와의 염기 및 아미노산 유사도는 각각 72%, 78%였다.

따라서 세계적으로 규명된 3종류의 HuCV genogroup들 모두 및 그 변이주들이 국내 유아들에서 산발적인 급성장염의 원인체로 존재함이 입증되었다. 이로서 한국에서 나타난 HuCVs ORF1^{pol}의 유전자 염기서열의 다양성이 처음으로 입증되었다.

3. 국외주와의 비교

국내 분리주들의 ORF1^{pol}의 염기 및 아미노산 서열을 국외의 세가지 genogroup을 대표하는 prototype NV, SMA, Sapporo virus, 5주의 각기 다른 HuCV 분리주들, 동물 prototype들인 feline calicivirus (FCV)와 rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)를 포함하는 도합 10주의 같은 부위의 염기 및 아미노산 서열과 비교하였고, dendrogram을 제작하였다 (그림 4). 이 분석에 사용된 국외 분리주들의 염기서열 자료는 EMBL/GenBank Data bases에 수록되어 있으며 accession number들은 다음과 같다: Lorsdale/93/UK (X86557), SHV/91/UK (L07418), SMA/76/USA (L23831), Sa-1283/84/J (L23832), TV24/91/Canada (U02030), SRSV/OTH25/89/Japan (L23829), NV8FIIa/68/US (M87661), Sapporo/82/J (S77903), FCV/F4/J (D31836), RHDV (AST/89)/Spain (Z49271).

고 찰

본 연구는 한국형 HuCV들의 지놈 다변성에 관한 첫번째 보고가 되겠다. 세계적인 분포도를 나타내는 급성장염/설사는 유아 사망율을 높이는 데 크게 기여해 왔으며 국내에서는 호흡기감염 다음으로 두번째의 높은 빈도를 나타내는데 원인은 근래 대부분이 바이러스성으로 보고되고 있다 [16,17]. 높은 유행률 및 빠른 전파력을 특징으로 하고 있는 HuCV는 오염된 물 또는 음식이 주 감염원이다. 국내에는 아직 HuCV에 대한 보고가 미미하나 [10] 지역적으로 가까운 일본 동경의 경우, 최근 5년 사이에 발발된 80번의 장염 발발에 관여된 환자의 50%에서 이 바이러스가 관찰되었으며 [18], 한번에 수천명의 국민학교 어린이 및 교사가 관여되는 등 폭발적 발발양태였다 [19]. 서구의 경우도 미국 전역에서 4년간 유발된 74번의 장염 발발 분석 결과, 50%가 이 바

이러스 때문이었음이 밝혀졌다 [20].

NV, SHV, Lorsdale virus의 염기서열이 보고 [6, 11-13]되면서 이들의 conserved region에서 선택된 primer를 사용한 RT-PCR로 세계 곳곳의 HuCV들이 탐지되고 있다 [10,15,21-24]. HuCVs는 RNA polymerase 부위의 염기서열 유사도에 따라 세가지 유전자군으로 분류된다. NV 유전자군에는 prototype NV8FIIa [11,12], SHV [6]가 있고, SMA 유전자군에는 prototype SMA [22], Lorsdale virus [13], 일본의 SRSV/Oth-25 [23], 영국의 HuCV 3-C [22,23], 캐나다의 MV/91 [7]이 있으며, Sapporo 유전자군에는 동물 분리주의 지놈과 유사한 일본의 HuCV/Sapporo [24]가 있다. 본 연구에서 한국 분리주들은 RNA polymerase region 유사도에 기초할 때 세가지의 genogroup 외에 변이주들도 관찰되었으나 capsid region에 기초할 때는 prototype HuCVs와 매우 다른 서열을 가진 것으로 사료되었다. Capsid 부위가 항원성을 표현하여 진단시약/예방백신개발에 필수적인 것을 감안할 때 본 연구에서 사용된 RNA polymerase region primer 지역에서 3'-end의 polyA까지의 3kb (즉 capsid 부위를 포함하도록) 지놈 서열 규명으로 이의 항원을 baculovirus expression system 또는 *E. coli*에서 대량제조가 필수적이겠다.

결 론

'사람 caliciviruses (HuCVs)'는 7.6 kb의 한줄짜리 RNA 지놈을 가진 조그마한 바이러스로 산발적/유행성 급성장염의 원인체로 최근 국내에서도 탐지되고 있다.

HuCVs의 RNA dependent RNA polymerase의 염기 및 아미노산 서열을 분석한 최근 보고들에 의하면 HuCVs는 Norwalk virus, SMA, Sapporo virus로 대표되는 세가지의 유전자군으로 분류된다. 본 연구에서는 NV ORF1^{pol}로부터 기인한 3개의 primer pair들 (p36/p35, p36/p51, p3/p51)을 이용한 RT-PCR로 산발적 소아장염 변검체에서 HuCVs를 탐지하고, PCR 산물인 206-470 bp의 cDNA 단편들을 클론하여 국내 분리주들의 ORF1^{pol}의 염기 및 아미노산 서열을 규명하였다. 11개의 RT-PCR 산물에서 positive-strand RNA virus의 RNA polymerase에 공통되게 존재하는 GLPSG와 YGDD 아미노산 motif가 관찰되었다. 보고된 국외주들 및 동물분리주들의 염기 및 아

미노산 서열과 비교 분석한 결과, 한국 분리주들이 3가지의 주요 유전자군에 해당되며 변이주도 있음을 알 수 있었다. 한 분리주는 SHA (NV 유전자군)와 100%의 아미노산 염기서열을 공유했고, 6개의 분리주는 SMA 유전자군과 90-99%의 아미노산 염기서열을 공유했고, 한 분리주는 Sapporo virus와 99%의 아미노산 서열 유사도를 나타내었다. 또한, 염기서열의 변이가 심한 분리주도 발견되었다. Capsid region의 변이는 더욱 심한 것으로 사료되었다.

이상은 한국에서 나타난 HuCVs의 유전자 염기서열의 다양성을 입증하는 첫번째 연구결과이다. HuCV 감염을 분자생물학적으로 분석하여 capsid 변이주 항원을 *E. coli* 또는 baculovirus expression system에서 대량으로 제조하여 진단시약/백신제조에 사용한다면 의학적, 보건학적, 환경학적으로 중요한 의미가 있겠다.

참 고 문 헌

- Cubitt WD, Bradley D, Carter M, Chiba S, Estes M, Saif L, Schaffer F, Smith A, Studdert M, Thiel HJ: Caliciviridae. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Arch Virol in press.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 10: 1075-1081, 1972.
- Schreiber DS, Blacklow NR, Trier TJ: The small intestinal lesion induced by Hawaii agent: acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Infect Dis 129: 705-708, 1974.
- Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, Kapikian AZ: Detection by immune electron microscopy of 26-27 nm virus-like particle associated with two family outbreaks of gastroenteritis. J Infect Dis 135: 20-277, 1977.
- Caul EO, Ashley C, Pether JVS: "Norwalk" like particles in epidemic gastroenteritis in the UK. Lancet 2: 1292, 1979.
- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN: Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. Science 259: 516-519, 1993.
- Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY: Identification of mini-reovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. J Virol 68: 3391-3396, 1994.
- Okada S, Sekine S, Ando T, Hayashi Y, Murao M, Yabuuchi K, Miki T, Ohashi M: Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. J Clin Microbiol 28: 1244-1248, 1990.
- Lewis, D: Norwalk agent and other small-round structured viruses in the U.K. J Infection 23: 220, 1991.
- Kim, Kyung H: Small, round-structured virus in Seoul: Determination of its importance and direct sequencing of a genome. J Kor Soc Virol 25: 23-30, 1995.
- Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M: Norwalk virus genome clone and characterization. Science 250: 1580-1583, 1990.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes M: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. Virology 195: 1-11, 1993.
- Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN: Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. J Gen Virol 76: 2349-2355, 1995.
- Jiang X, J Wang, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. J Virol 66: 6527-6532, 1992.
- Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30: 2529-2534, 1992.
- Kim K, Suh I, Kim J, Kim CW, Cho Y: Etiology or childhood diarrhea in Korea. J Clin Microbiol 27: 1192-1196, 1989.
- Kim K, Yang J, Joo S, Cho Y, Glass RI: Importance of rotavirus and adenovirus types 40

- and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* 28: 2279-2284, 1990.
18. Hayashi Y, Ando T, Utagawa E, Sekine S, Okada S, Yabuuchi K, Miki T, Ohashi M: Western blot (immunoblot) assay of small, round-structured virus associated with an acute gastroenteritis outbreak in Tokyo. *J Clin Microbiol* 27: 1728-1733, 1989.
 19. Kobayashi S, Morishita T, Yamashita T, Sakae K, Nishio O, Miyake T, Ishihara Y, Isomura S: A large outbreak of gastroenteritis associated with a small round structured virus among schoolchildren and teachers in Japan. *Epidemiol Infect* 107: 81-86, 1991.
 20. Vial PA, Kotloff KL, Tall BD, Morris JG, Levine MM: Detection by immune electron microscopy of 27-nm viral particles associated with community-acquired diarrhea in children. *J Infect Dis* 161: 571-573, 1990.
 21. Moe CL, Gentsch J, Ando T, Grohmann GS, Monroe S, Jiang X, Wang J, Estes MK, Seto Y, Humphrey C, Stine S, Glass RI: Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 32: 642-648, 1994.
 22. Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desseberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, Estes MK: Sequence diversity of small round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol* 68: 5982-5990, 1994.
 23. Cubitt WD, Jiang W, Wang J, Estes J, Estes MK: Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *J Med Virol* 43: 252-258, 1994.
 24. Matson DO, Zhong W, Nakata S, Numata K, Jiang X, Pickering LK, Chiba S, Estes MK: Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol* 45: 215-222, 1995.
-