

한타바이러스 호왕주의 L 유전자 절편의 염기서열

아산생명과학연구소 바이러스연구과
주용규 · 송대용 · 구형모 · 이호왕

=Abstract=

Molecular Characterization of the L Segment of Hantaan Virus, Strain Howang

Yong-Kyu Chu, Dae-Yong Song, Hyung-Mo Koo and Ho-Wang Lee

Department of Virology, Asan Institute for Life Sciences, 388-1,
Poongnap-dong, Songpa-ku, Seoul 138-040, Korea

Hantaan virus (HTNV), the etiologic agent of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), belongs to the genus *Hantavirus*, and has three single negative stranded RNA genome segments. HTNV strain Howang isolated from the blood of severe case of Korean HFRS is more virulent than HTNV 76/118 and the M and S genome segments' nucleotide sequence of Howang strain showed 93.5% and 94% homology to each segment of HTNV 76/118. We have obtained 6533 nucleotides long sequence of the L genome segment of Howang strain using reverse transcriptase in conjunction with PCR amplification and compared to other hantaviruses. The messenger sense of the L segment contains one long single long open reading frame of 2151 amino acids, which encodes a deduced RNA dependent RNA polymerase of 246.4 kDa calculated molecular weight protein. The nucleotide sequence of the L segment of Howang strain shows 93%, 74%, 66%, 65% homology to HTNV 76/118, Seoul virus 80/39, Puumala virus Hällnäs B1 and Sin Nombre virus, respectively. The amino acid sequence of the L segment of Howang strain shows 99%, 85%, 68%, 68% homology to HTNV 76/118, Seoul virus 80/39, Puumala virus Hällnäs B1 and Sin Nombre virus, respectively.

Key Words: Hantavirus, Hantaan virus strain Howang, L segment, Nucleotide sequence

서 론

유라시아 대륙의 신증후출혈열과 미주대륙의 한타바이러스 폐증후군의 병원체로 잘 알려져 있는 한타바이러스는 분야비리대과에 속하며, 3분절로 이루어진 단선구조의 negative-sense RNA를

유전자로 가지는 크기가 약 100 nm 정도의 소형 바이러스이다 [17]. 현재까지 많은 수의 한타바이러스들이 신증후출혈열 환자 및 한타바이러스 폐증후군 환자의 혈액과 조직으로부터 그리고 한타바이러스의 자연계 숙주동물인 쥐과 (Family Muridae)에 속하는 많은 종의 설치류의 폐장조직으로 분리된 바 있다 [5, 22]. 현재까지 한타바이러스

접수 : 1999년 9월 27일

교신저자: 주용규, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 아산생명과학연구소 바이러스연구과 전화) 2224-4169 팩스) 2224-4182 e-mail) ykchu@www.amc.seoul.kr

본 연구는 아산재단 연구과제 97-117 연구비 지원에 의한 결과로 이루어 졌음.

스에는 모두 9개의 혈청형이 알려져 있으며, 사람에게 질병을 일으키는 것이 확인된 한탄바이러스 혈청형, 서울바이러스 혈청형, 벨그레이드/도브라바 바이러스 혈청형, 푸말라바이러스 혈청형, 신놈브레바이러스 혈청형, 블랙크리카날바이러스 혈청형과 그 병원성이 아직 밝혀지지 않은 프로스펙트힐바이러스 혈청형, 타이바이러스 혈청형 그리고 쏘타팔리암바이러스 혈청형이 있으며, 각각의 혈청형바이러스에 따라 숙주동물을 달리한다 [5, 22]. 한국, 중국 및 극동아시아에서 발생하는 신증후출혈열의 병원체인 한탄바이러스는 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)의 폐장조직 및 환자의 혈액 및 조직에서 분리되었으며 [8], 전세계의 동물실험실 및 도시지역의 집쥐와 접촉하여 발생하는 신증후출혈열의 병원체인 서울바이러스는 집쥐 및 실험용 흰쥐의 폐장조직으로부터 분리되었고 [9], 유럽의 발칸반도 지역의 국가들에서 발생하는 중증의 신증후출혈열의 병원체인 벨그레이드/도브라바 바이러스가 노란목줄쥐 (*Apodemus flavicollis*) 및 환자의 혈액에서 분리되었다 [3, 6]. 미주대륙에서 발생하는 한탄바이러스 폐증후군의 병원체인 신놈브레 바이러스는 미국의 들쥐인 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리되었고 [14], 블랙크리카날바이러스는 미국 플로리다 지역의 목화쥐 (*Sigmodon hispidus*)에서 분리되었다 [16].

전세계적으로 매년 20만명 이상의 신증후출혈열 환자가 발생하는 것으로 알려져 있고 [11] 우리나라의 경우 매년 약 1000명 가량의 신증후출혈열 환자 발생이 보고되고 있으며 한탄혈청형 바이러스와 서울혈청형 바이러스에 의한 것으로 알려져 있다 [10].

호왕 바이러스주는 1990년 중증의 임상증상을 나타내어 사망한 한국형출혈열 환자의 초기혈액을 Vero E6 조직배양세포에 계대배양하여 분리한 바이러스이다. 호왕 바이러스주는 기존의 한탄바이러스와 달리 성체 마우스의 뇌내에 접종하였을 때 뇌염증상을 나타내어 사망하게 하는 보다 병원성이 강한 바이러스로 알려져 있다 [12]. 또한 호왕 바이러스주 세계의 유전자 절편중 중간 크기와 작은 크기의 유전자 절편의 염기배열을 분석하여, 이미 알려져 있는 한탄혈청형 바이러스들의 염기배열과의 차이를 분석하여 비교한 결과 호왕 바이러스주의 중 유전자 분절은 모두 3615개의 염기로 구성되어 있으며, 소 유전자 분

절은 모두 1696개의 염기로 이루어져 있는 것을 볼 수 있었다. 두 바이러스주 간의 중 유전자와 소 유전자 분절의 염기서열은 M절편이 93.5%, S절편이 94%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다 [1].

본 연구에서는 호왕 바이러스주의 대 유전자 분절 (L segment)의 염기서열을 분석하고 이로부터 유래되는 아미노산의 서열을 다른 한탄바이러스의 대 유전자 분절의 염기서열 및 아미노산 서열과 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 핵산 추출

중증의 신증후출혈열 환자 혈액으로부터 분리된 호왕 바이러스주 [12]를 Vero E6 (Vero C1008, ATCC CRL 1586)에서 8% 우태아 혈청과 Penicillin 100 units/ml과 Streptomycin 100 µg/ml이 함유된 Eagle's minimal essential medium (EMEM)으로 10일 간 배양하였다. 25 cm² 조직배양용기에 배양된 세포에 호왕 바이러스주로 감염시킨 조직배양세포를 인산완충용액 (pH 7.4)으로 두 번 세척한 후 5 ml의 Trizol™ (GIBCO BRL, USA)을 넣은 후 얼음수조에서 5분간 반응시킨 다음 cell scraper를 사용하여 배양기 표면의 감염세포를 수확하고 1.5 ml Microfuge tube에 1 ml씩 분주하였다. 분주된 감염세포 용해액에 200 µl의 Chloroform을 분주하고 vortexing하여 잘 섞은 다음 얼음수조에 10분간 놓아둔 후 섭씨 4도의 원심분리기에서 20분간 원침시켰다. 원침후 상층액을 수확하여 동량의 Isopropanol과 섞은 다음 영하 80도 냉동고에서 1시간 동안 두었다. 그 후 섭씨 4도의 원심분리기에서 30분간 원침시킨 다음 침전된 RNA를 70% 에틸알콜로 세척한 후 RNase가 없는 증류수에 용출시켰다.

2. 역전사 및 연쇄효소증합반응

Figure 1에서 보는 바와 같이 L segment는 5부분으로 나누어 역전사 - 연쇄효소증합반응 (RT-PCR)으로 상보 DNA를 합성 증폭하였으며 각각의 증폭된 부분들은 상호 겹쳐지게 하였으며 역전사 - 연쇄효소증합반응 (RT-PCR)에 사용된 프라이머 쌍들은 Table 1에서와 같다.

간단하게 설명하면 추출된 호왕 바이러스주의 리보핵산 9 µl와 1 µl의 0.1 pmole의 downstream 프

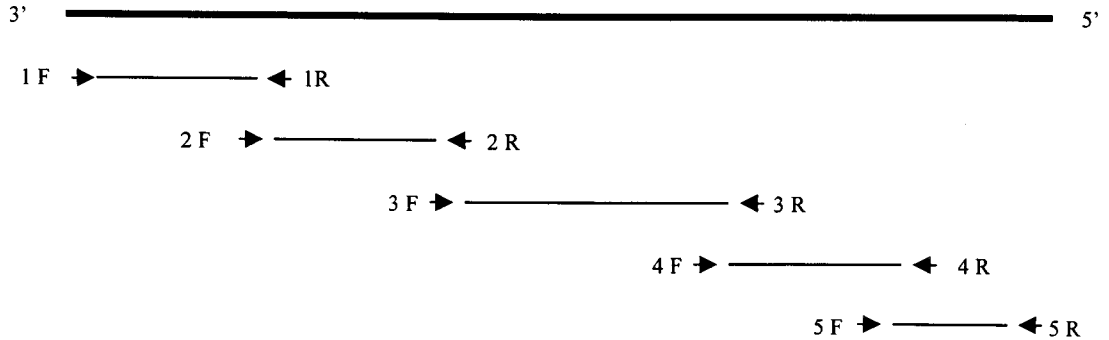


Figure 1. Strategy of RT-PCR for L segment of HTNV strain Howang.

Table 1. Nucleotide sequences of primers for the amplification of the L segment

Name	Position	Nucleotide sequence	Function
1 F	1 - 17	5'> TAGTAGTAGACTCCCTA <3'	Downstream primer
1 R	1013 - 1033	5'> ATAGGATGCTGGTGTATCTGG <3'	Upstream primer
2 F	915 - 932	5'> ACAGCAGTATTTGAGTGC <3'	Downstream primer
2 R	2946 - 2967	5'> GACCACTTTGTAGCATCTGCAC <3'	Upstream primer
3 F	2867 - 2886	5'> AGATGGGCATCAGGTGAAAG <3'	Downstream primer
3 R	4773 - 4795	5'> ACATATAGCCTCAGCTGTCCCTT <3'	Upstream primer
4 F	4619 - 4642	5'> CCAGACTCTCTATCTGTTGACCTA <3'	Downstream primer
4 R	6441 - 6459	5'> AACCTCCTCAACAGTACCA <3'	Upstream primer
5 F	5296 - 5313	5'> TGACTGTGCGAGGCTTGA <3'	Downstream primer
5 R	6525 - 6533 + T ₉	5'> TTTTTTTTTTAGTAGTAG <3'	Upstream primer

라이머를 혼합하여 섭씨 72도로 10분간 처리한 다음 얼음수조에 넣은 후 1 μ l의 Rnase inhibitor (Boeringer Mannheim, Germany), 2 μ l의 10 mM dNTP mixture (Boeringer Mannheim, Germany), 2 μ l DTT (GIBCO BRL, USA), 4 μ l의 5x RT reaction buffer (GIBCO BRL, USA), 1 μ l의 SuperScriptTM 역전사효소 (GIBCO BRL, USA)를 첨가하여 총 20 μ l의 1차 상보 DNA를 합성하였다. 합성된 1차 상보 DNA는 Table 1에서의 downstream 프라이머 및 upstream 프라이머를 사용하여 연쇄효소중합법 (PCR)로 증폭하였다. 유전자 증폭시 사용한 DNA polymerase는 Vent DNA polymerase와 Taq DNA polymerase를 일정량 혼합한 것 (Boeringer Mannheim, Germany)을 사용하여 유전자 증폭시의 실체 발생율을 최소화 하였다.

3. 클론제작 및 염기서열 분석

연쇄효소중합반응으로 증폭된 상보 DNA는 TA cloning vector (Invitrogen, Netherland)를 사용하여 클론을 만들었다. 합성된 클론은 competent *E. coli* INV α F' (Invitrogen, Netherland) 세포내로 형질 전환시켰다. 형질전환된 클론은 벡터 플라스미드 내의 lacZ 유전자 발현에 따라 청색의 콜로니를 선택하였으며, 선택된 플라스미드 벡터는 제한효소로 절단하여 벡터내 삽입된 바이러스 유전자의 크기를 확인한 후 올바른 크기의 유전자가 삽입된 클론의 바이러스 염기서열 분석을 하였다. [α -³⁵S]dATP (DuPont NEN, USA)와 dideoxy chain termination 방법을 이용한 T7 sequencing kit (Pharmacia, Sweden)를 사용하여 방사성동위원소로 표식된 DNA를 6% urea-polyacrylamide젤 상에서 전기영동한 다음 autoradiography를 실시하였다. 중첩되

주용규 등: L Sequence of HTNV Howang

TAGTAGTAGA CTCCTAAAT AACAACTCT GAAAAGAATG GATAATATA GAGAAATTCA CAATAAGCTG AAGGAGTTCT 80
CTCCTGGTAC ACTAACTGCA GTAGAATGTA TAGATTACCT TGACAGACTT TACGCAGTAA GACATGACAT CGTGGACCAA 160
ATGATTAAGC ATGATTGGTC TGATAATAAG GATTGAGAAG AGGCAATAGG AAAAGTACTA TTGTTTGCTG GGGTCCCCTC 240
AAACATCATA ACAGCACTAG AGAAAAAAT AATACCGAAT CATCCTACAG GAAAGAGTCT TAAGGCCTTC TTCAAGATGA 320
CACCTGATAA CTATAAAAT AGTGAACAA CCATTGAATT TGTTGAGGTT ACTGTACGG CAGATGTTGA TAAGGGAATA 400
AGAGAGAAGA AACTTAAATA TGAGGCAGGT TTAACTTACA TCGAACAAAGA GTTGCACAAG TTTTTTCTAA AGGGTGAAT 480
CCCAGCCT TATAAGATAA CATTAACTG AGTTGCACTG CGCACAGATG GTTCCAATAT CACTACACAA TGGCCAGTA 560
GAAGAAATGA TGGTGTGGC CTGTATATGA GGCTAGTTCA AGCTGAGATA AGCTATGTCA GAGAGCACTT GATCAAACT 640
GAGGAGAGAG CTGCACTAGA AGCCATGTTT AATTGGAAGT TCAATATAAG CACACACAAG AGTCAGCCAT ATTACATACC 720
AGATTATAAG GGGATGGAGC CGATAGGGC AAACATTGAG GATTTAGTTG ATTATTTTAA AGAATGGTTA TCTAGAGCTA 800
GGAACTTTC ATTTTTGAA GTTAAAGGTA CAGCAGTATT TGAGTGCTTC AATTCAAATG AGGCCAATCA TTGTCAAAGA 880
TATCCAATGT CCCGAAAGCC CAGAACTTC TACTAATAC AATGTTCTTT AATTACATCT TACAAGCCTG TACTACATT 960
GTCAGATCAA ATGATAGTA GAAGAGCCTG CTCATACATT TTGAACTTAA TCCCTGATAC ACCAGCATCT TATCTGATCC 1040
ATGATATGGC ATATAGATAC ATAACTTAA CAAGAGAAGA TATGATTAAT TACTATGCC CACGGATACA GTTCAAACAG 1120
ACACAAAATA TAAGAGAGCC AGGGACATTC AAGTTGACAT CAAGTATGTT AAGAGCAGAA TCAAAGGCAA TGCTAGATTT 1200
GCTTAATAAT CATAAAGTG GTGAAAAGCA TGGTGCTCAA ATAGAGAGCC TCAATATTGC TAGTCATATT GTGCAGTCTG 1280
AATCTGTTAG CTTAATTACA AAAATATTAT CTGATTAGA ATTAATATA ACTGAACCAT CAACTCAAGA ATAITCTACA 1360
ACTAAGCATA CTTATGTCGA TACAGTGTTA GATAAGTTTT TTCAGAATGA GACCCAGAAG TACCTGATAG ATGTGTTGAA 1440
AAAAACAACA GCGTGGCATA TAGGTCATCT CATAAGGGAT ATTACAGAAA GCTTAATTGC TCAITCAGGG TAAAACGAT 1520
CAAAGTACTG GTCCTTGAC TCATAACA ACGGCAATGT CATATTATC ATTCTCCAT CAAAGTCACT CGAGGTAGCA 1600
GGTTCCTTCA TTAGGTTTAT TACAGTTTTT AGAATAGGGC CTGGTTTGT AGATAAGGAT AACTGGATA CTATATTAAT 1680
TGATGGTGAC TCTCAATGGG GAGTATCTAA AGTCATAAGC ATTGATTAA ATAGGCTGCT AGCATTAAAT ATAGCTTTTG 1760
AAAAGGCTCT GATTGCAACA GCCACATGGT TTCAATACTA TACAGAAGAC CAAGGACAAT TCCCATTACA ATATGCAATT 1840
AGATCTGTGT TTGCAAATCA TTCCTTTTA GCTATATGTC AAAAGATGAA GCTCTGTGCC ATTTTGGACA ATTTACGTTA 1920
TCTTATACCT GCGGTAACAT CATTATACT TGGCTTCCCT TCACTGATAG AAAAGCTGTT TGAGCGTCCA TTTAAATCTT 2000
CCTTAGAGGT GTATATATAT TATAACATCA AAAGTTTATT GGTGCACTT GCACAAAATA ATAAGGCTAG ATCTATTC 2080
AAGGTAAAGC TACTAGGCTT AACAGTTGAC CAGTCAACCG TTGGTGAAG CGGAGTTTAT CCTTCATTCA TGTCGCGTAT 2160

Figure 2. Nucleotide sequence of the L genome segment of HTNV strain Howang.

Figure 2. Continued

AGTATACAAA CACTATAGAA GTTTAATATC TGAAGTGACA ACTTGTCTCT TTTTATTGGA GAAGGGTCTC CATGGAAATA 2240
TGAATGAAGA AGCAAAAATC CATCTTGAGA CAGTGGAAATG GGCACCTAAA TTCAGAGAAA AAGAAGAAAA GTATGGGGAA 2320
TCCCTAGTAG AAAATGGATA TATGATGTGG GAGCTACGAG AAAATGCTGA GTTGGCTGAA CAACAATTAT ACTGTCAAGA 2400
TGCTGTTGAG TTGGCAGCAA GAGAATTGAA TAAAGTTTTG GCTACAAAAGT CTAGTGTGTG TGCTAATAGT ATATTAAGCA 2480
AAAAATTGGGA AGAACCATAT TTCAGCCAAA CAAGAAATAT CAGCTTAAAA GGCATGTCAG GCCAGGTTC A GGAAGATGGC 2560
CATTTATCAT CATCTGTGAC AATAATAGAA GCCATCCGTT ATTTATCAAA TTCAAGACAT AATCCTAGCC TTTTAAAATT 2640
ATATGAGGAG ACAAGAGAGC AGAAAGCAAT GGCAAGAATT GTGAGAAAAGT ATCAAAGGAC AGAGGCAGAT AGGGGCTTTT 2720
TTATTACAAC ACTTCCTACG AGCTGTAGGC TCGAAATAT TGAGGACTAT TATGATGCCA TTGCCAAGAA CATATCTGAA 2800
GAATATATAT CATATGGGGG TGAAAAAAG ATTCTTGCAA TTCAGGGGGC ACTTGAGAAG GCCTTGAGAT GGGCATCAGG 2880
TGAAAGCTTT ATTGAACTTA GTAATCATAA ATTTATTAGG ATGAAGTGCA AACTCATGTA TGTTAGTGCA GATGCTACCA 2960
AGTGGTCACC AGGAGATAAT TCAGCAAAGT TCCGTAGATT TACTTCCATG TTACATAATG GACTTCCTAA TAATAAACTA 3040
AAAAACTGTG TAAITGATGC ACTTAAACAG GTTTATAAGA CAGACTTTTT TATGTCAAGG AAACCTAAGGA ACTATATTGA 3120
TAGCATGGAA AGCCTTGACC CACACATTA GCAAGTTTTG GATTTTTTTC CTGACGGGCA CCATGGGGAA GTAAAAGGAA 3200
ACTGGCTACA GGGCAACTTA AATAAGTGTT CTTCACTTTT TGGTGTGCA ATGTCATTAT TATTTAAACA AGTGTGGAAT 3280
AATTTATTCC CTGAGCTTGA TTGCTTTTTT GAGTTTGAC ATCACTCTGA TGATGCATTG TTTATTTATG GATATTTGGA 3360
ACCAGTGGAT GATGGGACAG ACTGGTTTTT GTTTGTTTCT CAACAGATCC AAGCAGGCCA TTTGCATTGG TTTAGTGTA 3440
ATACAGAAAT GTGGAAGAGT ATGTTAATC TACATGAACA TATACTTCTT CTAGGCTCTA TTAAGATCTC ACCAAAGAAG 3520
ACTACAGTAT CCCCACAAA TGCTGAATCT TTATCAACAT TTTTGAAGG CCGTGTGTA TCAATACCAT TTGTCAAGAT 3600
ACTATTAGGT TCTCTATCAG ATTTGCCAGG CTTAGGTTAT TTTGATGATT TAGCAGCAGC ACAAAGTAGA TGTGTCAAGG 3680
CTTTGGACCT CGGGGCATCA CCTCAGGTGC CACAGCTTGC TGTAACAATG TGTACCAGTA AAGTCGAAAG ATTGTATGGT 3760
ACTGCACCAG GTATGATAAA TCACCCTGCA GCATACTTAC ATGTTAAGCA TGCTGATACA CCGATTCCAT TGGGGGGAAA 3840
TGGTGTATG TCAATAATGG AGCTAGCAAC AGCTGGGATT GGGATGTCAG ATAAAAATCT ACTGAAACGA GCACTTCTAG 3920
GATATTCACA CAAGAGACAG AAGTCAATGC TGTATATAT GGGCTTATTC AAATTTTTGA TGAAGTTATC TGATGAAACA 4000
TTTCAACATG AGAGGTTAGG GCAATTTTCA TTTAITGGGA AGGTACAGTG GAAGATCTC ACACCAAAAT CTGAGTTTGA 4080
GTTTGTGAT ATGTACACAT CAAAATTCT AGAACTCTGG AGCAGTCAAC ATGTAECTTA TGATTATATC ATCCCCAAAG 4160
GTAGGGACAA TCTTCTCATT TATTTAGTTC GGAAGCTCAA TGATCCAAGC ATGTTACAG CAATGACCAT GCAGTCACCT 4240
TTACAACCTC GGTTTGAAT GCAAGCCAAA CAGCACATGA AAGTGTGTAG ATTGGAAGGA GAATGGGTAA CCTTCAGGGA 4320

주용규 등: L Sequence of HTNV Howang

Figure 2. Continued

AGTTCTGGCT GCTGCTAATA GTTTTGCAGA AAGTTATAGT CCTACTAGCC AAGATATGGA TCTATTCAA ACATTAACAA 4400
GTTGTACATT TTCTAAAGAG TATGCTTGGG AAGATTTTTT AAATGGAATT CACTGTGATG TTATCCCAAC AAAACAGGTT 4480
CAAAGGGCCA AAGTTGCACG AACATTTACA GTCAGAGAAA AAGATCAGAT CATACAGAAT AGTATTCTCTG CTGTTATTGG 4560
ATATAAATTT GCTGTTACTG TGGAGGAGAT GTCAGATGTA TTGGATACAG CCAAGTTCCC AGATTCTCTA TCTGTTGACC 4640
TGAAGACAAT GAAAGATGGA GTCTACCGTG AGCTAGGGTT GGACATATCT CTGCCTGATG TTATGAAAAG AATGCACCC 4720
ATGCTCTATA AATCTTCTAA ATCAAGAGTA GTCATTGTCC AAGGCAATGT TGAAGGGACA GCTGAGGCTA TATGTGCTTA 4800
TTGGTAAAA TCAATGTCGC TGGTAAAGAC TATAAGAGTA AAGCCTCATA AAGAAGTCCT CCAAGCAGTT TCAATTTTTA 4880
ACCGTAAAGA AGATATAGGA CAACAAAAAG ACTTGGCTGC CCTTAAACTA TGCATAGAAG TTTGGAGATG GTGTAAAGCA 4960
AATAGTGCTC CATATAGAGA TTGGTTCCAG GCCTTATGGT TTGAGGATAA GACCTTTTCA GAGTGGCTGG ATAGGTTCTG 5040
TAGGGTTGGA GTTCCGCCAA TTGATCCAGA GATCCAGTGT GCAGCATTAA TGATAGCTGA TATAAAGGT GATTATTCTG 5120
TCTTGCAGTT ACAAGCCAAT AGGCGAGCAT ATTCAGGTAA GCAATATGAT GCATACTGCG TACAGATATA TAATGAAGTG 5200
ACAAAGCTTT ATGAAGGAGA CTTGAGAGTA ACATTCAATT TTGGTCTTGA CTGTGCGAGG CTTGAGATT TCTGGGATAA 5280
AAGGCATAT ATATTAGAAA CATCAATTAC ACAGAAGCAT GTACTAAAGA TTATGATGGA TGAGGTCTCA AAGGAATTAG 5360
TAAAGTGTGG GATGAGATTT AATACAGAGC AAGTTCAGGG GGTACGGCAT ATGGTGTAT TTA AACAGA GTCTGGATT 5440
GAATGGGGAA AACCAAATAT TCCATGCATT GTCTATAAGA ACTGTGTCCT GAGAACAAGC CTTAGA ACTA CACAAGCAAT 5520
TAACCATAAA TTCATGATTA CAATAAAGGA TGACGGGCTT CGTGCTATTG CACAACATGA TGAAGATAGC CCAAGTTTCT 5600
TACTGGCTCA TGCATTTAC ACAATAAGAG ATATTAGGTA TCAAGCAGTA GATGCTGTAA GTAATGTGTG GTTCATTTAC 5680
AAAGGAGTTA AACTGTATTT AAATCCCAAT ATTTCACTG GCTTGCTTGA GAATTTATG AAGAATCTGC CAGCTGCAAT 5760
CCCTCTGCT GCTTATTCAT TGATTATGAA CCGTGCGAAG ATATCTGTTG ATCTCTTTAT GTTTAATGAC TTA CTAAAGC 5840
TGATTAACCC TAGGAATACA TTGGATCTAT CAGGCCTTGA AACAACAGGG GATGGTTTCA GTACTGTAAAG CTCAATGTCA 5920
AGCCGATAT GGTCTGAAGA AATGAGCTTA GTAGACGATG ATGAAGAACT TGATGATGAG TTCACAAITG ACTTGAAGA 6000
TGTGGATTTT GAAAATATAG ATATGGAGGC AGACATTGAA CACTTCTAC AAGATGAGAG CTCTTACACA GGAGATCTAT 6080
TAATCAGCAC AGAAGAACT GAGTCAAAGA AGATGAGGGG CATAGTGAAA ATACTTGAGC CTGTTAGACT GATTA AAAAGC 6160
TGGGTGTCAC GTGGATTGTC CATTGAGAAA GTATATAGTC CTGTTAATAT TATCTTAATG TCACGGTACA TCTCTAAAAC 6240
ATTTAATTA AGTACCAAAC AGGTCTCAIT ATTAGATCCG TATGATTGA CAGAATTAGA GAGCATCGTC CGAGGATGGG 6320
GAGAATGTGT TATTGATCAG TTCGAGAGTC TTGATAGAGA GGCTCAGAGT ATGGTTGTTA ATAAAGGGAT ATGCCCTGAG 6400
GATGTTATTC CTGACTCACT TTCTCTTTC AGGCACACAA TGGTACTACT GAGGAGGTTG TTCCCGCAGG ATTCTATATC 6480
TCTTCTAT TAGGCCTTCT TTTTTTTTCA TTTCCCGGAG CATACTACTA CTA

게 합성된 상보 DNA의 염기서열을 분석하기 위하여, 적어도 2개 클론을 양방향으로 염기서열을 분석하여 조사하였다. 호왕균주의 염기서열 분석은 MacVector (Kodak IBI, USA) 프로그램을 사용하여 이미 알려진 여러 종류의 한탄혈청형 바이러스의 L 유전자 분질의 염기서열과 비교하였다.

결 과

1. 호왕 바이러스주 L 유전자 분질의 염기서열 분석

호왕 바이러스주의 L 유전자 분질은 모두 6533개의 염기로 이루어져 있으며 (Figure 2), 한탄바이러스 76/118 [19]과 비교하여 약 93%의 상동률을 나타내고, 서울바이러스 80-39주 [2]와는 74%의 상동률을 푸말라바이러스 Hällnäs주 [21]와는 66%의 상동률을 그리고 한탄바이러스 폐증후군의 원인균인 신놈브레바이러스 [4]와 65%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 호왕 바이러스주 L 유전자 분질의 open reading frame (ORF)는 한탄바이러스 76/118과 동일하게 하나의 긴 ORF를 바이러스 상보핵산에 가지는 것을 확인하였으며 (Figure 2), 이 ORF는 38-40번 염기의 ATG codon으로부터 6491-6493번째의 TAG codon으로 이루어져 있으며, 모두 2151개의 아미노산으로 이루어진 약 246.4 KDa의 단백질을 encode하는 것을 볼 수 있었다. 호왕 바이러스주 L 유전자 분질에서 추정되는 아미노산은 76/118주와 98%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었으며 서울바이러스 80-39주와는 85%의 상동률을 푸말라바이러스 Hällnäs주와 신놈브레바이러스에 대하여 68%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

호왕바이러스주의 L 유전자 분질에서 합성될 것으로 예상되는 단백질 역시 모든 종류의 RNA dependent polymerase에 공통으로 잘 보존되어 있는 모티브들을 보유하고 있는 것을 확인할 수 있었다 [13, 15].

고 찰

우리나라의 경우 등줄쥐 및 환자혈액에서 분리된 한탄혈청형 바이러스의 경우 바이러스 분리주들 간의 M 및 S 유전자 분질간의 염기서열 차이는 2~3%에 불과한 것으로 알려져 있다 [18]. 서울바이러스의 경우에서도 우리나라와 일본 및 중

국의 집쥐에서 분리된 서울혈청형 바이러스들 사이의 염기서열의 차이는 약 5%에 불과할 뿐인 것으로 알려져 있다 [7]. 그러나 현재 우리나라에서 신증후출혈열의 유행지역으로 알려진 중북부지방에서 발생한 중증의 한국형출혈열 환자의 혈액으로부터 분리된 호왕 바이러스주의 M 및 S 유전자 분질간의 염기서열 차이는 기존에 우리나라에서 분리된 한탄혈청형 바이러스들과 더 큰 변이율을 나타내어 약 6%의 차이가 있음을 알 수 있었다 [1].

최근 미국의 들쥐인 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리된 바이러스들 사이에 유전적인 변이가 심하고 각각의 재조합 절편들의 유전적 재조합이 일어난다는 보고가 있었다 [20]. 그러나 호왕 바이러스주와 76/118 바이러스주 사이의 염기서열의 차이는 각각의 유전자 절편에서 거의 근사한 값을 나타내고 있으므로, 이러한 유전적 재조합에 의한 새로운 바이러스라고 볼 수는 없다. 그러나 차후 호왕 바이러스주가 분리된 유행지역에는 76/118 바이러스주와 유사한 바이러스들이 함께 존재하고 있으므로 우리나라에서 한탄바이러스의 자연계 숙주동물인 등줄쥐 사이에서 서로 유전적 차이가 나는 바이러스들 사이에서의 유전적 재조합이나 변이가 있을 가능성은 배제할 수 없다.

종래 등줄쥐의 폐장조직에서 분리된 한탄바이러스의 원형바이러스 (Prototype virus)인 76/118 바이러스주를 성체 마우스의 뇌내로 접종하였을 때 마비증상을 일으키거나 바이러스 증식으로 인한 사망의 예는 볼 수 없었으나, 호왕 바이러스주를 접종한 성체 마우스는 바이러스 증식으로 인한 마비증상과 접종 3주후 사망하는 병원성이 강한 바이러스인 것으로 나타났다. 또한 호왕 바이러스주의 항원성도 아주 높아 타 혈청형 바이러스들인 서울바이러스 및 푸말라혈청형 바이러스들에 대하여 기존의 한탄혈청형 바이러스들 보다 훨씬 높은 교차항체역가를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 그러나 호왕 바이러스주의 유전자 염기서열에서 추정되는 아미노산과 생성되는 단백질은 76/118 바이러스주와 큰 차이를 볼 수 없었다. L 유전자 분질은 세계의 바이러스 유전자 분질 중 그 크기가 가장 크며, L 유전자 분질에서 유래되는 단백질은 바이러스 유전자의 복제 및 전사에서 아주 중요한 역할을 수행하는 것으로 잘 알려져 있다. 한탄바이러스속에 속하는 바이러스들의

리보핵산 종속 리보핵산 중합효소인 L 단백질은 중합효소 모티브 부분들이 아주 잘 보존되어 있으며 소수의 아미노산 변이가 있을 지라도 잘 보존된 변이를 유지하고 있는 것을 볼 수 있다. 호왕 바이러스주의 대 유전자 분절에서 추정되는 L 단백질 역시 리보핵산을 유전자로 하는 모든 바이러스들의 리보핵산 종속 리보핵산 중합효소들과 마찬가지로 중합효소의 효소활성에 주요한 기능을 수행하게 하는 A~E의 중합효소 모티브들이 잘 보존되어 있는 것을 볼 수 있었다.

따라서 이미 밝혀진 호왕 바이러스주의 M 및 S 유전자 분절과 함께 L 유전자 분절의 클론을 보유하게 됨으로써 차후 Reverse genetic 연구의 바탕을 마련한 것이다.

결 론

1990년 중증의 임상증상을 나타내어 사망한 한국형출혈열 환자의 초기혈액으로부터 분리한 호왕 바이러스주는 기존의 한탄바이러스 보다 병원성이 강한 바이러스이다. 중합효소 연쇄중합방법을 사용하여 호왕 바이러스주의 L 유전자 분절을 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여, 이미 알려져 있는 한탄바이러스속에 속하는 바이러스들의 염기서열과의 차이를 분석하여 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 호왕 바이러스주의 L 유전자 분절은 모두 6533개의 염기로 이루어져 있으며, 38번째 핵산에서 6490 핵산까지의 하나의 긴 open reading frame (ORF)을 가지는 것을 볼 수 있었다.

2. 호왕 바이러스주의 L 유전자 분절의 염기서열에서 합성될 것으로 추정되는 단백질은 모두 2151개의 아미노산을 가지며 추정되는 분자량은 약 246.4 kDa이었다.

3. 핵산 염기서열을 비교한 결과 한탄 76/118 바이러스주와는 약 93%의 상동률을 나타내고, 서울 바이러스 80-39주와는 74%의 상동률을, 푸말라바이러스 Hällnäs균주와는 66%의 상동률을 그리고 신놈브레바이러스 주와는 65%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

4. 아미노산 서열을 분석한 결과 한탄 76/118 바이러스주와는 약 98%의 상동률을 나타내고, 서울 바이러스 80-39주와는 85%의 상동률을, 푸말라바이러스 Hällnäs균주와 신놈브레바이러스주에 68%의 상동률을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 주용규, 이호왕: 한탄바이러스 호왕균주의 M, S 유전자 절편의 염기서열 및 분자생물학적 특성. 대한바이러스학회지 27: 59-68, 1997.
- 2) Antic D, Lim BU, Kang CY: Nucleotide sequence and coding capacity of the large (L) genomic RNA segment of Seoul 80-39 virus, a member of the hantavirus genus. *Virus Research* 19(1): 59-65, 1991.
- 3) Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, Van der Groen G and LeDuc JW: Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 38: 132-137, 1992.
- 4) Chizhikov VE, Spiropoulou CF, Morzunov SP, Monroe MC, Peters CJ, Nichol ST: Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. *J Virology* 69(12): 8132-8136, 1995.
- 5) Chu YK, Rossi C, LeDuc JW, Lee HW, Schmaljohn CS and Dalrymple JM: Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology* 198: 196-204, 1994.
- 6) Gligic A, Dimkovic N, Xiao SY, Buckle GJ, Jovanovic D, Velimirovic D, Stojanovic R, Obradovic M, Diglisic G, Micic J, et al: Belgrade virus: a new hantavirus causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia. *J Infect Dis* 166(1): 113-120, 1992.
- 7) Kariwa H, Yoshimatsu K, Sawabe J, Yokota E, Arikawa J, Takashima I, Fukushima H, Lundkvist A, Shubin FN, Isachkova LM, Slovova RA, Leonova GN, Hashimoto N: Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Research* 59(2): 219-28, 1999.
- 8) Lee HW, Lee PW, Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308, 1978.
- 9) Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever from wild urban rats. *J In-*

- fect Dis* **146**: 638-644, 1982.
- 10) **Lee HW**: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev Infect Dis Suppl.*, **2**: 864, 1989.
 - 11) **Lee HW and van der Groen G**: Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* **36**: 62-102, 1989.
 - 12) **Lee HW, Chu YK**: Comparison of antigenicity of Hantaviruses by polymerase chain reaction for new vaccine candidate strain against hemorrhagic fever with renal syndrome and isolation of a new Howang virus. *Korea National Academy* **32**: 121-133, 1993.
 - 13) **Muller R, Poch O, Delarue M, Bishop DH, Bouloy M**: Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* **75**: 1345-1352, 1994.
 - 14) **Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ**: Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262(5135)**: 914-917, 1993
 - 15) **Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N**: Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* **8(12)**: 3867-3874, 1989.
 - 16) **Rollin PE, Ksiazek TG, Elliott LH, Ravkov EV, Morzunov S, Livingstone W, Monroe M, Glass G, Ruo S, Khan A, Childs J, Nichol ST and Peters CJ**: Isolation of Black Creek Canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. *J Med Virol* **46**: 35-39, 1995.
 - 17) **Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA and Dalrymple JM**: Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* **148**: 1005-1011, 1983.
 - 18) **Schmaljohn CS, Arikawa J, Hasty SE, Rasmussen L, Lee HW, Lee PW, Dalrymple JM**: Conservation of antigenic properties and sequences encoding the envelope proteins of prototype Hantaan virus and two virus isolates from Korean haemorrhagic fever patients. *J Gen Virol* **69(8)**: 1949-55, 1988.
 - 19) **Schmaljohn CS**: Nucleotide sequence of the L genome segment of Hantaan virus. *Nucleic Acids Research* **18(22)**: 6728, 1990.
 - 20) **Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldmann H, Sanchez A, Peters CJ, Nichol ST**: Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* **200(2)**: 715-723, 1994.
 - 21) **Stohwasser R, Raab K, Darai G, Bautz EK**: Primary structure of the large (L) RNA segment of nephropathia epidemica virus strain Hallnas B1 coding for the viral RNA polymerase. *Virology* **183(1)**: 386-391, 1991.
 - 22) **Xiao SY, LeDuc JW, Chu YK and Schmaljohn CS**: Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology* **198**: 205-217, 1994.