

## 한국에 분포하는 레오바이러스의 분리 및 동정

<sup>1</sup>고려대학교 의과대학 미생물학교실, 바이러스병 연구소, <sup>2</sup>고려대학교 대학원  
송기준<sup>1</sup> · 강병철<sup>2</sup> · 이영은<sup>1</sup> · 백락주<sup>1</sup> · 이용주<sup>1</sup> · 송진원<sup>1\*</sup>

=Abstract=

### Isolation and Characterization of Reovirus in Korea

Ki-Joon Song<sup>1</sup>, Byung Chul Kang<sup>2</sup>, Young Eun Lee<sup>1</sup>, Luck Ju Baek<sup>1</sup>,  
Yong-Ju Lee<sup>1</sup> and Jin-Won Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Institute for Viral Diseases,  
<sup>2</sup>Korea University Graduate School, Korea University, Seoul 136-705, Korea

Reovirus was found to inhabit both the respiratory and the enteric tract of human and animals. The genome of reovirus comprises 10 segments of double-stranded RNA, total size 24 kbp. Nine strains of reovirus were isolated from human and field mice in Korea. Aseptically collected sera from human and lung tissues from field mice were used for virus isolation. For serotype determination, hemagglutination inhibition test was used, and three strains were confirmed to type 2 and six strains to type 3. To determine the genomic diversity and molecular phylogeny of reoviruses isolated in Korea, part of S4 genomic segment of reovirus was enzymatically amplified and directly sequenced. In nucleotide level, Apo98-35 strain showed 15.4%, 19.3%, and 14.4% differences compared to type 1 (T1L, Lang), type 2 (T2J), and type 3 reference strains, respectively. In amino acid level, Apo98-35 strain showed 10.5%, 13.7%, and 9.5% differences compared to type 1, type 2, and type 3 reference strains, respectively. Using the maximum parsimony method based on 285 bp spanning region of the S4 genomic segment, phylogenetic analysis indicated that Apo98-35 from Korea formed different phylogenetic branch. Our data obtained by sequence and phylogenetic analyses of reoviruses are consistent with the distinct geographically dependent evolution of reoviruses in Korea.

**Key Words:** Reovirus, S4 segment, Isolation, Hemagglutination inhibition test

### 서 론

*Reoviridae*과 (family)는 1959년 Sabin에 의해 [20] echovirus 10 group이 새로운 과로 재분류되어 형성되었다. 레오바이러스 (reovirus)는 호흡기 (res-

piratory)와 소화기 (enteric)에서 분리되며 사람에게 질환을 일으키지 않아 (orphan) 이와 같은 이름으로 명명되었다. *Reoviridae*과에는 9개의 속이 분류되어 있으며 [14] 이들 바이러스 중에서 레오바이러스, 오비바이러스 (*Orbivirus*), 로타바이러스 (*Rotavirus*) 및 콜티바이러스 (*Coltivirus*) 4 속의 바이

접수 : 1999년 6월 17일

\*책임저자: 송진원, 서울시 성북구 안암동 5가, 고려대학교 의과대학 미생물학교실 Tel: (02) 920-6408, Fax: (02) 923-3645, E-mail: jwsong@kucn.korea.ac.kr

\*이 논문은 1998년도 고려대학교 특별연구비에 의하여 지원되었음.

러스가 사람에게 감염을 일으키며 다른 5 속의 바이러스는 어류, 곤충 및 식물을 감염시키는 것으로 알려져 있다. 레오바이러스과의 바이러스들은 70~85 nm 크기의 정이십면체 구조로 외피는 없으며 이중구조의 capsid를 갖는 특이한 바이러스로 세포질에서 증식되며 세포파괴와 함께 방출된다. 레오바이러스과의 원형인 (prototype) 레오바이러스는 이중가닥 RNA genome이 10개의 분절로 나누어진 유전학적 특성을 갖고 있으며 10개의 분절은 전기영동상 크기에 따라 large (L1, L2, L3), medium (M1, M2, M3), small (S1, S2, S3, S4) 세 종류의 분절로 나누어 진다 [22]. 2개의 단백을 coding 하는 S1 분절을 제외한 각 분절들은 각기 다른 1개의 단백을 coding하여 L1 분절에서는 RNA-dependent RNA polymerase 기능을 하는  $\lambda 3$  단백, L2 분절에서는 transferase 기능을 하는  $\lambda 2$  단백, L3 분절에서는 dsRNA와 결합하며 zinc metalloprotein 기능이 있는  $\lambda 1$  단백, M1 분절에서는 아직 그 기능이 규명되지 않은  $\mu 2$  단백, M2 분절에서는 penetration 및 transcriptase의 활성화에 작용하는  $\mu 1$  단백, M3 분절에서는 ssRNA와 결합 및 바이러스의 morphogenesis에 관여하는  $\mu NS$  단백, S1 분절에서는 세포부착과 혈구응집반응에 관여하는  $\sigma 1$  단백 및 그 기능이 규명되지 않은  $\sigma 1s$  단백, S2 분절에서는 dsRNA와 결합하는  $\sigma 2$  단백, S3 분절에서는 ssRNA와 결합하여 assortment에 관여하는  $\sigma NS$  단백, S4 분절에서는 바이러스의 안정성 및 zinc와 결합하는 기능이 있는  $\sigma 3$  단백질이 생성되며 이들 단백 중 3개 ( $\mu NS$ ,  $\sigma NS$ ,  $\sigma 1s$ )의 비구조 단백을 제외한 나머지 8개의 단백질은 구조 단백질로 레오바이러스 capsid를 구성한다 [7,13]. 레오바이러스의 outer capsid는  $\mu 1$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 3$ ,  $\lambda 2$  단백질로, inner capsid는  $\lambda 1$ ,  $\sigma 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 2$  단백질로 구성된다 [12,24]. 레오바이러스 중에서도 사람을 포함한 포유류에서 분리되는 레오바이러스는 중화항체 및 혈구응집저지반응에 의해 3종류의 혈청형으로 구분되며 [17,20,23] 레오바이러스 1형의 원형인 Lang strain (T1L)은 건강한 소아에서, 2형의 원형인 Jones strain (T2J)은 소아 설사 환아에서, 3형의 원형인 Abney strain (T3A)과 Dearing strain (T3D)은 상기도 감염 및 설사 환아에서 분리되었다 [16,18,20].

국내에서는 1970년대 초반 등줄쥐 및 *Microtus*의 비장 및 림프절에서 레오바이러스 2형으로 동정된 4주가 분리되었으며 혈구응집저지반응 및 간접형광항체법 등의 검사법을 이용하여 사람, 집쥐

및 들쥐에서의 항체 및 항원 보유율에 대한 조사가 시행된 바 있으나 [1~6] 레오바이러스 혈청형의 분포양상, 각 혈청형별에 대한 항체검사 및 유전학적 분석은 시행되지 않았다. 레오바이러스와 병원성과의 연관성은 많은 연구에도 불구하고 확실하게 규명되지 않았으며 대부분의 경우 불현성 감염이 주이나 일부 영아와 유아에서 설사 및 상기도 감염의 원인체로 보고되고 있으며 최근들어 그 병원성과의 연관성에 대한 연구가 다시 활발히 진행중에 있다.

본 연구에서는 한국인과 국내 들쥐에 분포하고 있는 레오바이러스를 분리하여 혈청형을 동정하였으며 S4 분절의 일부 염기서열 및 deduced 아미노산서열을 결정하여 이를 토대로 기존에 분석된 Genbank상의 외국에서 분리된 레오바이러스와 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 가검물

표준균주는 레오바이러스 혈청형 1형인 Lang strain (T1L, ATCC VR-230), 2형인 Jones strain (T2J, ATCC VR-231), 3형인 Dearing strain (T3D, ATCC VR-824)를 사용하였다. 국내 레오바이러스주의 분리를 위해서는 신증후출혈열 환자 혈액 20건 및 들쥐 폐조직 40건을 사용하였다.

### 2. 레오바이러스 분리

12well plate에 monolayer로 배양된 Vero E6 세포 위에 가검물 (사람인 경우는 혈청을, 들쥐인 경우는 폐조직 10% 부유액) 0.5 ml을 가하여 37°C에서 90분간 흡착시킨 후 5% fetal calf serum, 1% Hepes, L-glutamin (584 mg/L), gentamicin (50  $\mu$ g/L), streptomycin (10 mg/L) 10,000 units penicillin 그리고 fungizone (0.5  $\mu$ g/L)이 포함된 5% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배양액을 1.5 ml 가한 다음 37°C에서 5일간 배양한 후 상층액은 -70°C에 보관하고 세포는 T25 flask에 계대배양하였다. 몇 차례 계대배양을 시행하여 cytopathic effect가 관찰되면 간접형광항체법으로 레오바이러스의 증식 유무를 확인하였다.

### 3. 레오바이러스 혈청형 동정

레오바이러스 혈청형의 동정은 간접형광항체법과 혈구응집저지반응법으로 시행하였으며 각 혈

청형에 대한 표준 항혈청은 표준균주를 Balb C mouse에 접종하고 2주 후에 추가접종한 후 4주에 전채혈하여 제조하였다. 혈청형의 동정은 레오바이러스가 분리된 사람 및 들쥐의 혈청을 표준균주와 반응하여 검사하였으며 제조한 표준혈청을 대조혈청으로 사용하였다. 간접형광항체법 및 혈구응집저지반응은 일반적인 방법을 사용하여 아래와 같은 방법으로 시행하였다.

Vero E6 세포에 레오바이러스 각 표준균주를 접종하여 제조한 항원 슬라이드를 냉아세톤에 10분간 고정시키고 공기중에서 건조시킨 다음, 인산완충식염수 (0.01 M phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)로 희석한 검사 혈청을 가하고 37°C에서 30분간 일차반응시키고 인산완충식염수로 세척한 후 건조하였다. 이차반응은 FITC-conjugated anti-mouse IgG 및 FITC-conjugated anti-human IgG를 슬라이드 각 well에 25 µl씩을 가하고 37°C에서 30분간 반응하였으며 인산완충식염수와 증류수로 세척, 건조 후 mounting medium을 가하고 cover glass를 덮어 형광현미경 (Axioscop, Zeiss, Germany)하에서 400배의 배율로 특이형광을 관찰하였다.

혈구응집저지반응을 위한 항원은 레오바이러스 각 표준균주를 Vero E6 cell에 3~5일 배양한 배양 상층액을 이용하였다. 항원의 응집역가는 50 µl의 항원을 희석액 (0.4% ABS pH 9.0)으로 2배 계단 희석하고 0.5% 사람 O형 혈구부유액 (PBS, final pH 7.6) 50 µl를 넣어 잘 혼합한 후 실온에 30분간 방치한 다음 응집 여부를 관찰하여 응집소의 역가를 결정하였다. 0.1 ml의 혈청을 0.9 ml의 생리식염수에 희석하여 4°C에 보관한 12 ml의 acetone에 한 방울씩 떨어뜨리며 강하게 진탕한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심침전하여 상층액의 acetone을 버리고 다시 12 ml의 acetone을 가하여 1시간 동안 4°C에 방치하였다. acetone을 제거한 후 진공상태에서 건조하고 희석액 (ABS pH 9.0) 1 ml을 가한 다음 4°C에서 16~18시간 방치 후 1,500 rpm에 5분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 처리된 혈청 25 µl를 희석액 (0.4% ABS, pH 9.0)으로 1:20에서 1:10,240까지 2배 계단 희석한 후 레오바이러스 응집소 (각각 8 unit) 25 µl를 가하여 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음 혈구부유액 50 µl를 가하여 혼합하고 다시 실온에 30분간 방치한 후 결과를 판독하였다.

#### 4. 레오바이러스 RNA 분리 및 Primers

레오바이러스 배양 상층액 0.1 ml을 RNAzol™ B (CINNA/ BIOTEX, Houston, TX) 0.8 ml로 균질화시킨 후 Eppendorf tube에 옮기고 chloroform 80 µl를 넣고 잘 섞은 다음 4°C에 5분간 방치하였다. 4°C에서 12,000 x g로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액에 0.4 ml의 isopropanol을 첨가하여 얼음수조에 45분간 방치한 후 위와 동일한 방법으로 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 버리고 75% ethanol 1 ml로 세척한 후 RNA 침전물을 진공건조하여 20 µl의 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수에 용출시켜 소분한 후 -70°C에 보관하였다. 레오바이러스 S분절 S1, S2 및 S4에 대한 혈청형별 34개의 Primer는 Genbank상의 염기서열을 토대로 제작하였다 (Table 1).

#### 5. 역전사 종합효소연쇄반응

분리한 RNA 10 µl에 DMSO 7 µl를 첨가하여 97°C에서 5분간 가열한 후 즉시 냉각하고 반응액 25 µl당 denatured RNA 8.5 µl, 100 nM primer, 20 unit RNase inhibitor (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 250 µM dNTPs, 100 unit Superscript II (GIBCO BRL, Grand Island, NY)를 넣고 mineral oil을 첨가한 후 72°C에서 10분간 처리하고 37°C에서 10분, 42°C에서 90분간 반응한 후 효소를 비활성화시키기 위해 95°C에서 10분간 반응시켰다.

종합효소연쇄반응의 반응액 50 µl당 cDNA 산물 2.5 µl, 50 nM primer쌍, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 1 unit DynaZyme (Finnzyme OY, Finland)을 넣고 mineral oil을 첨가한 후 DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)로 35 회 주기로 증폭하였다. 증폭에 사용한 주기는 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 3분이며 첫번째 주기는 94°C 5분, 마지막 주기는 72°C 10분을 사용하였으며 증폭한 후 1% agarose gel상에서 PCR 산물을 확인하였다.

#### 6. 레오바이러스 cDNA의 염기서열 결정

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER)를 사용하여 반응액 20 µl당 Terminator Ready Reaction Mix 8

**Table 1.** Primers for reovirus used in this study

Primer	Serotype	Sequence ( 5' → 3' )
S1-850F	1	CGG CGT ACG TAC CCT GAG C
S1-873F	1	GTT ATG ATA CGA GCG ATT TTA CAA
S1-1259R	1	CTA CGA CAT TTG CCG CCG T
S1-1286R	1	ATG CGT GAC CGT TAT TTA GAA
S1-207F	2	CCA TTG AAT CGG GAG TTA GTG AGA
S1-832F	2	CAC TCG GCT ACT GCG TCT CAT
S1-857F	2	AGG CTG TGG ACT TCG TGG TTA
S1-1206R	2	ACG TCG TTG ACA GTG GGT TAG TAG
S1-1227R	2	TCG TTG ACA GTG GGT TAG TAG TTG
S1-1315R	2	CAG AGT GGA ATG CCG GGG AAC
S1-1F	3	GCT ATT GGT CGG ATG GAT CC
S1-537F	3	TCC CCT CTC AAT CCG TAA TAA C
S1-743F	3	CAA GGA TAG GCG CAA CTG AGC A
S1-886F	3	ACA TCC CCG AAT TTG AGG TAT C
S1-1236R	3	GTT GTC GTC GGG TGG TGC G
S1-1264R	3	CTC CAT CCT GCC ACT GCT CCA C
S1-1384R	3	AGT GCC GCG GGG TGG TCT GA
S1-1397R	3	GAT GAA ATG CCC CAG TGC CG
S3-1F	2	ACT ATG GCT TCC TCA CTC AG
S3-341F	2	GCA GCT ACT TCA AGG TCG ACC
S3-567R	2	TAC TAC CGT GTC ACC ATC GAG TG
S3-1107R	2	CCA TTA CAC GCG AAT TGG AAA C
S3-1F	3	GCT AAA GTC ACG CCT GTC GT
S3-160F	3	ATT CGT ACG GGA TTC TTT TC
S3-690R	3	ATT CGC GTC CAC CTC ACA TCC ATA
S3-1198R	3	GAT GAT TAG GCG TCA CCC AC
S4-29F	2	CGC AAT GGA GGT GTG CCT G
S4-138F	2	ATC TCA GCA CAG CCG GAC ATG
S4-319R	2	TTC CAG TGA GCA GTA ACC
S4-671R	2	TCT TGA ATC TGA GAA TGT AC
S4-1F	3	GCT ATT TTT GCC TCT TCC CA
S4-679F	3	TGG AAT GGG GTG TGA TGG TTT ATG
S4-342R	3	CAA CGA AGG ACA GCA TAC CCC G
S4-1156R	3	GCC CGG CGC TGT GAA GAT G
S4-1196R	3	GAT GAA TGA AGC CTG TCC CA

**Table 2.** Reovirus strains compared in this study

Genbank Number	Virus strain	Serotype
M13139	Reovirus type 1 (Lang)	1
K02739	Reovirus type 3	3
U15072	Reovirus type 3	3
U15073	Reovirus clone 15	n.a.
U15074	Reovirus clone 18	n.a.
U15075	Reovirus clone 23	n.a.
U15076	Reovirus clone 31	n.a.
U15077	Reovirus clone 44	n.a.
U15079	Reovirus clone 50	n.a.
U15081	Reovirus clone 87	n.a.
U15082	Reovirus clone 8	n.a.
U15084	Reovirus clone 9	n.a.
U63307	Reovirus L/C	n.a.
U63308	Reovirus L/T2+T3	n.a.
X60066	Reovirus type 2 (Jones)	2

μl, 1 μM primer 3.2 μl와 30~100 ng template을 첨가하고 mineral oil을 가하여 thermal cycler로 25회 주기로 증폭하였다. 증폭에 사용하는 주기는 96℃ 30초, 50℃ 15초, 60℃ 4분이며 첫번째 주기는 96℃ 5분을 사용하고, 증폭 종료 후에는 위 반응액을 3 M Sodium acetate (pH 4.6) 2 μl, 95% ethanol 50 μl와 혼합하여 얼음 위에 10분간 방치한 뒤 11,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 침전물을 70% ethanol 250 μl로 세척한 후 진공건조 시킨 뒤 6 μl loading buffer (deionized formamide 5 μl, 25 mM EDTA (pH 8.0) containing 50 mg/ml blue dextran) 1 μl로 녹였다. loading 직전에 90℃에서 2분간 변성시킨 후 1.5 μl씩을 4% polyacrylamide sequencing gel에서 3000 V로 전기영동하고 ABI PRISM™377 DNA Sequencer로 염기서열 결과를 판독하였다.

7. 레오바이러스 염기서열과 deduced 아미노산서열의 분석 및 계통분석

LaserGene program (DNASTAR, Madison, WI)을 사용하여 레오바이러스의 S 분절 염기서열을 비교분석하고 PAUP Verson 3.1 (Illinois Natural History Survey, Champaign, IL) (Swofford, 1993)을 이

**Table 3.** Antibody titers of sera from human and field mice harboring reoviruses by hemagglutination inhibition test

Sample	Antibody titer			Serotype
	Type 1	Type 2	Type 3	
H96-1318	320	640	40	2
H95-2544	160	80	>2560	3
Apo97-201	40	80	320	3
Apo98-35	40	160	40	2
A.pen97-43	<20	80	>2560	3
A.pen97-45	<20	160	>2560	3
A.pen97-58	<20	320	2560	3
A.pen97-59	<20	320	2560	3
A.pen97-60	20	640	40	2

용하여 이들 서열들의 계통수를 작성하였다. 염기서열 및 계통분석에 이용한 Genbank상의 염기서열을 Table 2에 표시하였다.

결 과

1. 레오바이러스 분리

사람 및 들쥐의 가검물로부터 9주의 레오바이러스를 분리하였다. 사람의 혈청으로부터 2주를 분리하였으며, 들쥐의 폐조직에서는 국내 들쥐 중 우점종으로 가장 널리 주로 평야지대에 분포되어 있는 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)에서 2주, 산악지역에 주로 분포하고 있는 흰뺨적다리붉은쥐 (*Apodemus peninsulae*)에서 5주를 분리하였다.

처음 3대 계대배양까지 바이러스 증식에 의한 세포괴사성은 관찰되지 않았으며 4대 계대배양부터 세포괴사성이 관찰되었고 5대 이상 계대배양시 세포괴사성은 3일 정도에 50% 이상 발생하였다. 간접형광항체법에 의한 바이러스의 증식 확인시험에서 3대 계대배양에서 항원 검색이 가능하였으며 5대 계대배양 후에는 95% 이상의 세포에서 바이러스 증식을 확인할 수 있었으며 이러한 증식양상은 표준균주의 증식양상과 동일하였다.

2. 레오바이러스 혈청형 동정

혈구응집저지반응 결과 국내에서 분리된 9주의 레오바이러스는 2형이 3주, 3형이 6주이었으며

송기준 등: 레오바이러스 분리동정

	33	132
Apo98-35	ATGGAGGTGTGCCTACCCAATGGTTATCAGGTCGTGGATCTGATAAATAACGCTTTTGAAGGCCGTGTCAATCTACAGCGCACAGGAGGGATGGGACA	
M13139	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....T...A.....G..A.....	
K02739	.....T.G.....C..C.....A.....CT..T.C.....T...A.....G..A.....	
U15072	.....T.G.....C..C.....A.....CT.A.T.C.....T...A.....G..A.....	
U15073	.....T.G.....C..C.....A.....AT..T.C.....T...A.....G..A.....	
U15074	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....G..T.....	
U15075	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....G..T.....	
U15076	.....T.G.....C..C.....AT..T.C.....G..T...A...C.....G..A.....	
U15077	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....T.....	
U15079	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....T.....	
U15081	.....T.G.....C..C.....CT..T.....T...A.....A.G..A.....	
U15082	.....T.G.....C..C.....CT..T.....T.....G..A.....	
U15084	.....T.G.....C.....A..CT..C.C.....A...A.....A.....	
U63307	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....T...A...G...G..A.....	
U63308	.....T.G.....C..C.....CT..T.C.....T...A.....G..A.....	
X60066	.....G..T..C..C.....A..C..CTG..C.....A...A..A...T...T..T..C.A.....	
	133	232
Apo98-35	AAACAATCTCAGCACAGCCAGATATGATGGTGTGGTGGCGCCCTCGTCTGCATGCATTGTCTAGGTGTTGTTGGATCTCTACAACGACAGCTGAGACA	
M13139	.....A.....T.....T.....AG.....	
K02739	.....A.....T.....T.....G...AG.....	
U15072	.....C.....A.....T.....AG.....	
U15073	.....A.....T.....T.....G...AG.....	
U15074	.....C.....A.....T.....AG.....	
U15075	.....C.....A.....T.....AG.....	
U15076	.....A.....T.....A.....	
U15077	.....A.....T.....AG.....	
U15079	.....C.....A.....T.....AG.....	
U15081	.....A.....T.....AG.....	
U15082	.....C.....T.....G...AG.....	
U15084	.....G..C.....C.....G...A.T..C.....	
U63307	.....A.....T.....AG.....	
U63308	.....A.....T.....AG.....	
X60066	.....G..C.....A.....G...G..A..G..G..A..AG.....	
	233	317
Apo98-35	TCTGCCTCATCATAGATGTAACCAACAGATTCCGCCAACAGGATCATGTTGATGAGCAGTTTGCTGACAGACCGTGTCACTGCTCA	
M13139	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C..C...TA...C..A...C.TGTTAC.GCTCA...	
K02739	.T.....C.....T.....T..T...T.C..C...TA...C..A...TC.TGTTAC.GCTCA...	
U15072	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C..C...TA...C..C..A...C.TGTTAC.GCTCA...	
U15073	.T.....C.....T.....T..T...T.C..C...TA...C..A...TC.TGTTAC.GCTCA...	
U15074	CT.....C.....T..G..A..CT.C...C.T...C..A...TC.TGTTACAGCTCA...	
U15075	CT.....C.....T..G..A..CT.C...C.T...G..TC.TGTTACAGCTCA...	
U15076	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C...TA...A...TC.TGTTAC.GCTCA...	
U15077	.T.A...C.....T..G..A..CT.C...C.T...A...TC.TGTTACAGCTCA...	
U15079	CT.....C.....T..G..A..CT.C...C.T...A...TC.TGTTACAGCTCA...	
U15081	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C..C...TA...C..A...C.TGTTAC.GCTCA...	
U15082	CT...C.....C.....T..G...C..T..G...T.....T.....C..G...TC.TGTTAC.GCTCA...	
U15084	.T.....T..G...T..T..A...T...C...T..A...C...TC.TGTTAC.GCTCA...	
U63307	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C..C...TA...C..A...C.TGTTAC.GCTCA...	
U63308	.T.....C.....T.....C..T..T...T.C..C...TA...T..C..A...C.TGTTAC.GCTCA...	
X60066	CT...C.....AG..C.....C.A.....CT.C...T.....TC.GTTAC.GCTCA...	

Figure 1. Alignment and comparison of nucleotide sequences of the S4 segment of reoviruses.

Apo98-35	MEVCLPNGYQVVLDLNNAFEGRVSIYSAQEGWDTISAQPDMMVCGGAVVCMHCLGVVGSLQRRLLKHLPHHRCNQQIRQQDHDVDEQFADRPFCHCS
K02739	.....H.....K.....H..Y..V.....VTAH.
M13139	.....H.I.....K.....H..Y..V.....VTAH.
U15072	.....H.I.....K.....H..Y..V.L.....VTAH.
U15073	.....H.I.E.....K.....H..Y..V.....VTAH.
U15074	.....H.....K.....Y..V.S.....VTAH.
U15075	.....H.....K.....Y..V.....VTAH.
U15076	.....H..E.....T.....K.....H..Y..V.....VTAH.
U15077	.....H.....K.....Y..V.....VTAH.
U15079	.....H.....K.....Y..V.....VTAH.
U15081	.....H.....T.....K.....H..Y..V.....VTAH.
U15082	.....H.....K.....Y..V.....VTAH.
U15084	.....H.....K.Q.....H..Y..V.....VTAH.
U63307	.....H.....C.....K.....H..Y..V.....VTAH.
U63308	.....H.....K.....H..Y..VH.....VTAH.
X60066	.....H.I..W.....Q.....K.....K.....L.....Y..V.....VTAH.

Figure 2. Alignment and comparison of amino acid sequences of the S4 segment of reoviruses.

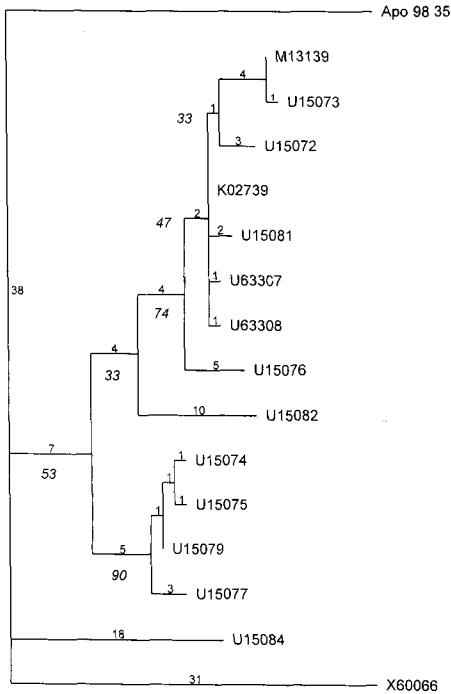


Figure 3. Phylogenetic tree based on the 285 nucleotide sequences of the S4 segment of reoviruses, constructed by the PAUP method.

사람 및 등줄쥐에서 분리된 레오바이러스는 2형 (H96-1318, Apo98-35)과 3형 (H95-2544, Apo97-201) 이 각각 1주씩이었고, 흰넓적다리붉은쥐에서 분리된 레오바이러스는 2형이 1주 (A.pen97-60)이었고 나머지 4주는 3형 (A.pen97-43, A.pen97-45, A.

pen97-58, A.pen97-59)이었다 (Table 3).

간접형광항체법 검사 결과에서는 항원 및 항체의 검색은 가능하였으나 혈청형은 구분할 수 없었다.

### 3. RT-PCR 및 염기서열 분석

레오바이러스 S분절의 증폭에서 혈청형 2형인 Apo98-35주 S4 분절의 증폭산물만이 확인되었다. 각 혈청형별 표준균주의 염기서열을 토대로 제작한 34개의 primer를 사용하였음에도 불구하고 표준균주의 각 분절과 Apo98-35주의 S4 분절만이 증폭되었으며 같은 2형인 다른 국내 분리주의 경우 증폭이 되지 않은 것은 국내에 분포하고 있는 레오바이러스는 표준균주의 염기서열과는 변이 정도가 매우 높은 것으로 추정할 수 있었다.

증폭된 Apo98-35주 S4 분절의 염기서열 285 bp 및 이를 토대로 한 아미노산서열을 2형의 표준균주 (T2J)와 다른 형의 염기서열 및 아미노산서열과 비교정렬하였다 (Figure 1, 2). 염기서열의 비교정렬에서 국내에서 분리된 레오바이러스 Apo 98-35주의 염기서열은 기존에 알려진 레오바이러스 염기서열과 비교 시 deletion, insertion 등의 frame shift mutation은 관찰되지 않았으나 점돌연변이율은 매우 높아 기존의 레오바이러스 염기서열과 비교 시 13.7~19.3%의 차이를 나타내었으며 1형의 표준균주와는 15.4%, 2형의 표준균주와는 19.3%, 3형의 표준균주와는 14.4%의 차이를 나타내었다. 국내분리주를 제외한 기존의 레오바이러스주들은 0.4~15.8%의 변이율을 나타내었으며 특히 2

형의 표준균주를 제외한 비교에서는 0.4~10.2%의 변이만을 나타내었다. 아미노산서열의 비교정렬에서도 국내에서 분리된 Apo98-35주는 기존에 알려진 레오바이러스와 비교 시 9.5~13.7%의 차이를 나타내었으며 1형의 표준균주와는 10.5%, 2형의 표준균주와는 13.7%, 3형의 표준균주와는 9.5%의 차이를 나타내었다. 국내분리주를 제외한 기존의 레오바이러스주들은 0~8.4%의 변이로 매우 높은 상동성을 나타내었다. 특이하게 염기서열 및 아미노산서열의 비교정렬에서 국내 분리 레오바이러스주인 Apo98-35주는 동일한 2형 혈청형인 X60066주와 가장 큰 차이를 나타내었다.

#### 4. 계통분석

레오바이러스 S4 분절의 285 bp 염기서열을 토대로 PAUP법을 이용한 계통분석을 시행하여 Figure 3의 결과를 얻었다. 염기서열을 토대로 한 계통수 상에서 레오바이러스 각 혈청형은 독자적인 group이나 branch를 형성하고 있었으며 국내에서 분리된 Apo98-35주는 기존의 레오바이러스주들과는 구분되는 독립된 branch를 형성하였다.

## 고 찰

선진국의 경우 성인의 대부분은 레오바이러스 3가지 혈청형에 대한 항체를 보유하고 있으며 1세 이전에는 25%, 3세에는 약 70%의 항체양성율이 보고되고 있다 [10,11,19]. 항체양성율은 지역적이나 계절적인 변화 요인은 없으며 3가지 혈청형에 따른 감염 정도의 차이도 없는 것으로 알려져 있다. 국내에서는 1975년 및 1983년에 사람 및 집쥐를 대상으로 레오바이러스에 대한 항체조사 결과 사람에서는 65.3%와 91.9%, 집쥐에서는 65.2%의 항체양성율이 보고되었다 [1,2]. 1975년도에 조사된 양성율 65.3%와 1983년도에 조사된 91.9%의 양성율의 차이는 혈구응집저지반응과 간접형광항체법에 따른 검사법 상의 차이로 생각되며 성별에 의한 차이는 관찰되지 않았다.

레오바이러스는 사람의 O형 혈구와 잘 응집하는 생물학적 특성을 갖고 있어 혈구응집저지반응으로 혈청형의 동정이 용이하여 본 실험에서도 혈구응집저지반응을 이용하여 혈청형을 동정하였다. 특이한 점으로는 3가지 혈청형에 대한 항체분포 상에서 1형에 대한 항체가 상대적으로 낮게 조사되었으며 분리된 9주 중에서도 1형은 동정되지

않았다. 본 실험에서 분리한 레오바이러스주가 9주로 상대적으로 시료의 수가 적은 점은 있으나 1981년 이 등의 보고에서 [5] 국내 등줄쥐 및 갈밭쥐로부터 분리한 4주의 레오바이러스가 모두 2형이었던 점을 고려하면 국내에서는 상대적으로 2형 및 3형의 분포가 높은 것으로 추정되었다. 본 연구를 통해 국내에 분포하고 있는 들쥐 중에서 등줄쥐와 흰넓적다리붉은쥐로부터 레오바이러스가 분리되어 국내에 분포하고 있는 총 13종의 들쥐 중 3종에서 레오바이러스가 분리되었으며 사람으로부터는 국내에서는 처음으로 2주가 분리되었다.

레오바이러스의 10개의 분절 중 S1 분절은 다른 분절들에 비하여 그 변이 정도가 매우 높아 다른 혈청형간의 상동성이 26~49%에 지나지 않으며 다른 분절들은 각 혈청형간의 비교 시 75~96%의 상동성을 보인다 [8,9,15,21,25]. S1 분절에서는 세포부착과 혈구응집반응에 관여하는  $\sigma$ 1 단백질이 만들어지며 혈청형 구분의 표준단백으로 이용되고 있어 각 혈청형간의 비교 시 상동성이 매우 낮게 관찰되나 다른 분절들의 경우에는 reassortment에 의해 각 혈청형간의 분절 교환이 발생하여 혈청형간의 비교 시 높은 상동성이 관찰된다. 이와같이 레오바이러스의 S1 분절을 제외한 다른 분절들의 경우에는 혈청형과 관계없는 다양성을 보이고 있으며 DNA 바이러스에 비해 상대적으로 변이율이 높고 다른 RNA 바이러스와 비교 시에도 이중가닥의 유전자 구조와 10개에 달하는 분절로 인해 유전학적 분석에 많은 장애 요인이 되고 있다. 본 연구에서도 30개가 넘는 많은 수의 primer를 표준균주의 염기서열에 근거하여 제조한 후 증폭을 시도하였으나 9개의 분리주 중 단 1주의 한 분절만의 증폭이 가능하였다. 상대적으로 변이가 적은 L이나 M분절을 대상으로 하지 않고 S 분절을 대상으로 유전자 분석을 시도한 점이 이러한 결과의 한 원인이나 L이나 M분절에 비해 S분절에서 생성되는  $\sigma$ 단백은 혈청형 동정, 세포부착능, 바이러스의 안정성 및 분절간의 reassortment에 관여하는 주요 기능을 지니고 있어 레오바이러스 유전자 분석의 주 표적으로 부각되며 유전자 분석시 비교 가능한 Genbank상의 유전정보 확보가 용이한 점 등으로 인해 S분절을 선정하였다.

국내분리주 중 유전자 분석이 가능하였던 Apo98-35주의 염기서열 및 계통분석 결과는 특이한 양상을 나타내어 2형으로 동정된 Apo98-35주의 S4의



염기서열은 기존의 표준균주 1, 2 및 3형과 14~19%의 차이를 보였으며 계통분석 상에서도 기존의 혈청형과는 구분되는 독자적인 branch를 형성하였다. S1 분절을 제외한 다른 분절들의 경우 reassortment에 의해 각 혈청형간의 분절 교환이 발생하여 혈청형과의 연관성이 매우 낮은 것으로 규명되어 있으나 3가지 혈청형과 비슷한 정도의 변이를 보이며 혈구응집저지반응에서 1형 및 2형간의 항체가 차이가 2배 희석배수 차이 정도로 낮게 관찰된 점들을 고려하면 S1 분절의 유전자 분석 및 상호교차 중화반응을 통하여 규명하여야 할 문제이기는 하나 기존의 혈청형과는 다른 특이한 혈청형일 가능성도 배제할 수 없었다.

사람의 타액이나 배설물에는 다량의 레오바이러스가 존재하며 이러한 가검물에서의 레오바이러스 분리는 용이한 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 분리된 레오바이러스의 경우에는 사람 특히 20대 및 50대 성인의 혈액으로부터 분리되었으며 이는 viremia상태의 환자로부터 분리되었다고 하겠다. 레오바이러스와 사람의 질병과의 연관관계를 보면 대부분의 경우 불현성 감염이 주이고 일부 영아와 유아에서 설사 및 상기도 감염의 원인체로 보고되고 있으나 성인에서 질병과의 연관성이 규명된 경우는 보고된 바 없다. 이상의 사실들을 종합하여 볼 때 성인에서 레오바이러스 viremia가 초래된 원인에 대한 연구와 국내 사람에서의 혈청형별에 따른 혈청학적 역학조사 및 국내 분리주에 대한 광범위한 유전자 분석이 필요할 것으로 생각되었다.

## 결 론

국내에 분포하고 있는 레오바이러스의 특성을 규명하기 위하여 사람 및 들쥐 가검물로부터 레오바이러스의 분리 및 유전자 분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람으로부터 2주, 등줄쥐에서 2주 및 흰넓적다리붉은쥐에서 5주로 총 9주의 레오바이러스를 분리하였으며 국내분리주의 증식양상은 표준균주의 증식양상과 동일하였다.

2. 혈구응집저지반응을 이용한 혈청형 동정에서 2형이 3주, 3형이 6주로 국내 사람 및 들쥐에 분포하고 있는 레오바이러스는 2형과 3형이 주종을 점하고 있었다.

3. 레오바이러스 S4 분절의 염기서열 및 아미

노산서열 분석에서 국내에서 분리된 레오바이러스 Apo98-35주는 표준균주와 비교 시 13.7~19.3% 및 9.5~13.7%의 높은 변이율로 기존의 표준균주와는 각각 유사한 정도의 차이를 나타내었다.

4. 계통분석 상에서 Apo98-35주는 기존의 혈청형과는 구분되는 독자적인 branch를 형성하여 국내에 분포하고 있는 레오바이러스는 지역적으로 독자적인 진화과정을 거친 것으로 나타났다.

이상의 결과를 통해 본 연구는 한국인에서 처음으로 레오바이러스를 분리하고 국내에 분포하고 있는 레오바이러스의 유전정보를 최초로 제시하여 향후 레오바이러스 연구의 기초자료를 확립하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) 김용상, 이호왕: 한국에서의 Reovirus 분리. 고려의대잡지 **17**: 129-136, 1980.
- 2) 이호왕, 성인화, 백락주, 주용규, 김금철: 인천시민, 인천집쥐의 Reovirus에 대한 항체분포. 대한바이러스학회지 **13**: 29-34, 1983.
- 3) 이호왕, 성인화, 신종호: 한국에서 분리한 Reovirus의 혈구응집반응. 대한바이러스학회지 **8**: 9-13, 1978.
- 4) 이호왕, 이몽주, 성인화, 백락주, 오용주: Hantaan virus에 감염된 등줄쥐 폐조직 중의 Reovirus 검출. 대한바이러스학회지 **13**: 1-9, 1983.
- 5) 이호왕, 이평우, 성인화, 백락주, 김용상: 한국에서의 Reovirus 분리. 대한바이러스학회지 **11**: 27-33, 1981.
- 6) 황영희, 이평우, 성인화, 이호왕: 한국인의 Reovirus에 대한 항체분포. 대한바이러스학회지 **5**: 21-25, 1975.
- 7) Both GW, Lavi S, Shatkin AJ: Synthesis of the all the gene products of the reovirus genome in vivo and in vitro. *Cell* **4**: 173-180, 1975.
- 8) Dermody TS, Schiff LA, Nibert ML, Coombs KM, Fields BN: The S1 gene nucleotide sequences of prototype strains of the three reovirus serotypes: characterization of reovirus core protein  $\sigma 2$ . *J Virol* **65**: 5721-5731, 1991.
- 9) Duncan R, Horne D, Cashdollar LW, Joklik WK, Lee PWK: Identification of conserved domains in the cell attachment proteins of the three serotypes of reovirus. *Virology* **174**: 399-409, 1990.

- 10) **Jackson GG, Muldoon RL, Johnson GC, et al.:** Contribution of volunteers to studies on the common cold. *Am Rev Respir Dis* **88**: 120-127, 1962.
- 11) **Lerner AM, Cherry JD, Klein JO, et al.:** Infections with reoviruses. *N Engl J Med* **267**: 947-952, 1962.
- 12) **Mayor HD, Jamison RM, Jordan LE, Mitchell MV:** Reoviruses. II. Structure and composition of the virion. *J Bacteriol* **89**: 1548-1556, 1965.
- 13) **McCrae MA, Joklik WK:** The nature of the polypeptide encoded by each of the ten double-stranded RNA segments of reovirus type 3. *Virology* **89**: 578-593, 1978.
- 14) **Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martalli GP, Mayo MA, Summers MD:** Virus taxonomy - the classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna: Springer-Verlag, 1994.
- 15) **Nibert ML, Dermody TS, Fields BN:** Structure of the reovirus cell-attachment protein: a model for the domain organization of  $\sigma 1$ . *J Virol* **64**: 2976-2989, 1990.
- 16) **Ramos-Alvarez M, Sabin AB:** Enteropathogenic viruses and bacteria. Role in summer diarrheal diseases of infancy and early childhood. *JAMA* **167**: 147-156, 1958.
- 17) **Rosen L:** Serologic groupings of reovirus by hemagglutination-inhibition. *Am J Hyg* **71**: 242-249, 1960.
- 18) **Rosen L, Hovis JF, Mastrota FM, Bell JA, Huebner RJ:** Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family. *Am J Hyg* **71**: 258-265, 1960.
- 19) **Rosen L, Hovis JF, Mastrota FM, et al.:** An outbreak of infection with a type 1 reovirus among children in an institution. *Am J Hyg* **71**: 266-274, 1960.
- 20) **Sabin AB:** Reoviruses. *Science* **130**: 1387-1389, 1959.
- 21) **Seliger LS, Giantini M, Shatkin AJ:** Translational effects and sequence comparisons of the 3 serotypes of the reovirus S4 gene. *Virology* **187**: 202-210, 1992.
- 22) **Shatkin AJ, Sipe JD, Loh PC:** Separation of 10 reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Virol* **2**: 986-991, 1968.
- 23) **Stanley NF:** Reoviruses. *Br Med Bull* **23**: 150-154, 1967.
- 24) **Vasquez C, Tournier P:** The morphogenesis of reovirus. *Virology* **17**: 503-510, 1962.
- 25) **Wiener JR, Joklik WK:** The sequences of the reovirus serotype 1, 2, and 3 L1 genome segments and analysis of the mode of divergence of the reovirus serotypes. *Virology* **169**: 194-20, 1989.