

## Infectious bursal disease virus(국내분리주)의 variable VP2 gene의 분석

권혁무 · 김대규 · 성환우\*

강원대학교 수의학과  
국립수의과학검역원\*  
(1999년 3월 3일 접수)

### Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease viruses isolated in Korea

Hyuk-moo Kwon, Dae-kyu Kim, Hwan-woo Seong\*

*Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University  
National Veterinary Research and Quarantine Service\**

(Received Mar 3, 1999)

**Abstract** : A 474-base pair segment covering the hypervariable region of VP2 gene from six Korean infectious bursal disease virus(K-IBDV) isolates(K1, K2, SH/92, 225, 269, 310) and one attenuated IBDV(DAE) were amplified using RT-PCR, sequenced, and compared with published sequences for IBDV. K-IBDV isolates(K1, K2, SH/92, 225, 269) and foreign very virulent(vv) IBDV strains had 94.93~100% amino acid sequence similarity. K-IBDV isolate 310 and other K-IBDV isolates had 84.31~86.07% amino acid sequence similarity. Attenuated strain(DAE), like other attenuated strain, has substitution at positions 279(D to N) and 284(A to T) as well as in the serine-rich heptapeptide region. Five K-IBDV isolates except 310 isolate share unique amino acid residues at positions 222(A), 256(I), 294(I) which are not present in other standard and attenuated strains. At the two hydrophilic region, K-IBDV isolates except 310 isolate had identical amino acids comparing with Belgium vv IBDV 894VB but had four amino acid substitutions comparing with Chinese vv IBDV F9502. The SWSASGS heptapeptide is conserved in all K-IBDV isolates. The sequence of K-IBDV isolate 310 was markedly different from other IBDV strains, evolving from a separate lineage than the others. By phylogenetic analysis, Five K-IBDV isolates except 310 isolate were categorized in one group with foreign vv IBDV isolates but K-IBDV isolate 310 was categorized in a separate group which was differentiated from other compared IBDV strains.

**Key words** : infectious bursal disease virus(IBDV), VP2 gene, sequence, very virulent IBDV.

---

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비(971-0605-038-2) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

Address reprint requests to Dr. Hyuk-moo Kwon, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

## 서 론

전염성 F 낭병 바이러스(*Infectious bursal disease virus*, IBDV)는 면역억제와 3~6주령의 닭에서 높은 치사율을 나타내는 전염성이 높은 전염성 F 낭병(*Infectious bursal disease*, IBD)의 원인체이다. IBDV는 두 가지 혈청형으로 분류되는데 혈청형 1은 닭에 병원성을 나타내고 병원성이 다양한 반면 혈청형 2는 칠면조에서 분리되고 닭에서 병원성을 나타내지 않는다<sup>2,4</sup>.

IBDV는 envelope가 없는 icosahedral capsid 내에 double stranded(ds) RNA로 구성된 두 개의 segment(A와 B)로 구성되어 Bimaviridae family에 속한다<sup>5</sup>. Segment A(약 3.3kbp)는 VP2, VP3, VP4로 되는 109kD의 precursor polyprotein과 VP5를 발현하고, segment B(약 2.9 kbp)는 dsRNA polymerase인 VP1을 발현한다<sup>6-8</sup>. VP2는 IBDV의 주요 구조 단백질이며 주요 숙주방어 항원으로 중화항체를 유도하는 항원부위를 포함하고 있다<sup>9-10</sup>. IBDV 분리주들은 VP2의 아미노산 206-350 사이에서 다양한 변이를 나타내고 있다<sup>11-12</sup>. 이 부위는 중화 단클론 항체를 유도하는 주요 항원결정인자를 포함하고 있어 이 부위의 양 끝부분에 있는 두 hydrophilic sequence의 결합은 중화 단클론 항체(17/82)의 결합을 막는다<sup>13</sup>. 표준 혈청형 1의 IBDV로 만든 백신에 의하여 예방되지 않는 미국 변이주들(A, E, GLS)은 이들 두 hydrophilic region에서 1~2개의 아미노산 변화가 확인되었다<sup>10,14,15</sup>. 1986년에 유럽에서 처음 확인된 병원성이 매우 강한 IBDV(very virulent IBDV, vv IBDV)는 이후 다수의 유럽국가, 일본, 중국, 이스라엘, 한국 등에서 분리되고 있는데 이들은 60~100%의 폐사율을 나타냈다<sup>16-21</sup>. 이들 vv IBDV는 항원적으로 classical IBDV와 비슷하지만 classical IBDV를 방어할 수 있는 모체항체 수준에서 감염을 일으킬 수 있다<sup>16</sup>.

우리나라에서 IBD는 다양한 백신을 이용하여 예방하여 왔지만 1992년에 vv IBDV가 분리된 이후 피해가 확인되고 있다<sup>21</sup>. IBD를 예방하기 위해서는 야외에서 유행하는 IBDV의 특성을 파악하는 것이 가장 중요하다. 본 연구에서는 vv IBDV로 확인된 SH/92 국내분리주와 최근 IBDV 국내분리주의 VP2 gene의 variable region을 분석하고 외국분리주들과 비교하였다.

## 재료 및 방법

IBD 바이러스 : 국내에서 유행하는 IBDV를 분리하기 위하여 1997년에 IBDV 감염이 의심되는 농장의 닭으로부터 F낭을 채취하였다. F낭 유제를 준비하여 발육 계란의 chorioallantoic membrane(CAM)에 접종하여 5주의 IBDV(K1, K2, 225, 269, 310)를 분리하였다<sup>22</sup>. 분리한 바이러스는 IBDV 특이 primer를 이용한 RT-PCR과 IBDV 특이 형광항체를 이용하여 IBDV로 확인하였다. 대조군 바이러스는 1992년에 분리된 vv IBDV(SH/92)<sup>21</sup>를 국립수의과 학검역원로부터 분양받아 사용하였고 백신주인 DAE는 SPF 발육란의 섬유아세포에 약 65대 연속세대대양한 것을 사용하였다.

IBDV RNA의 분리와 정제 : 접종한 발육 계란의 CAM을 회수하여 PBS(pH 7.4)를 첨가한 후 세번 얼렸다 녹인 다음, 가위로 세절한 후 조직마쇄기로 처리한 다음 3,000g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 70,000g에서 1.5 시간동안 원심분리후 침전물을 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 부유시킨 후 chloroform으로 1회 추출한 다음 RNA를 분리정제하였다. IBDV 백신 바이러스는 백신을 TNE(100mM Tris-HCl [pH 9.0], 100mM NaCl, 1mM EDTA) 완충액에 부유시킨 후 chloroform으로 1회 추출한 다음 RNA를 분리정제하였다. RNA 분리와 정제는 Kwon *et al*<sup>23</sup>의 방법에 의하여 실행하였다. Sodium dodecyl sulfate(최종농도 2%)와 proteinase K(최종농도 250 µg/ml)를 chloroform으로 추출한 바이러스 용액에 더하고 55℃에서 5분간 유지시킨 후 acid phenol(pH 4.0)과 chloroform/isoamyl alcohol(49 : 1)로 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit(BIO 101)를 사용하여 정제하였다. 정제한 바이러스 RNA는 DEPC 처리 멸균증류수에 부유한 후 -70℃에 보관하면서 reverse transcriptase(RT) 반응에 이용하였다.

Oligonucleotide primers : 이미 발표된 IBDV의 염기서열을 참고로 합성한 P2.3(5'CCCAGAGTCTACACCATA3')과 RP5.3(5'TCCTGTGCCACTCTTTC3') primer를 RT 반응과 PCR에 사용하였다<sup>18</sup>. 이 primer들은 VP2 gene의 variable region을 특이적으로 증폭시킬 수 있게 설계되었다.

RT반응과 PCR : IBDV의 ds RNA genome을 denaturation시키기 위하여 정제한 RNA를 90% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 부유시킨 후 98℃에서 5분간 처리하였다. RNA 3-5µl에 5µl의 10X PCR buffer(500mM, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.0% Triton X-100), 1µl의 10mM dNTPs, 0.5µl의 10mM DTT, 250ng의 RP5.3 primer, 40 unit의 RNasin, 9µl의 25mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 200unit의 Molony murine

leukemia virus RT(GIBCOBRL)를 첨가하고 최종 50µl의 반응액은 DEPC로 처리한 멸균증류수를 더하여 얻었다. 이렇게 준비한 RT 반응을 위한 혼합액을 37℃에서 90분간 반응시켰다. PCR은 RT 반응액 5µl에 10µl의 PCR buffer, 250ng의 P2.3과 RP5.3 primer, 12µl의 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5unit의 *Taq* DNA polymerase(Promega)를 더하고 최종 반응액 100µl는 멸균증류수를 더하여 얻었다. PCR은 94℃에서 1분의 denaturation, 52℃에서 1분의 annealing 그리고 72℃에서 2분의 extension을 한 cycle로 35 cycle 실행하였다. 처음 denaturation과 마지막 extension은 각각 94℃에서 5분, 72℃에서 10분간 실행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 함유한 1% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

cDNA의 cloning과 염기서열 분석 : PCR로 증폭된 cDNA를 TA cloning kit(Invitrogen)를 이용하여 cloning 하였다. Recombinant plasmid로 competent cell(*E. coli* INVαF cell)을 transformation 시킨 후 kanamycin과 X-gal이 첨가된 LB agar에서 무색투명한 집락을 선발하였다. Mini-prep 방법으로 분리한 plasmid DNA를 *Eco* RI으로 처리하

여 cDNA의 삽입여부를 확인하였다. Mini-prep에서 삽입이 확인된 경우 염기서열을 결정하기 위한 다량의 plasmid DNA를 얻기 위하여 maxi-prep을 실시하였다. DNA 염기서열은 dideoxy-nucleotide terminator sequencing법을 이용하여 automatic DNA sequencer(ALFexpress, Pharmacia Biotech)로 결정하였다. 얻어진 IBDV 국내분리주의 염기와 아미노산 서열을 DNASIS software(Hitachi)를 이용하여 외국분리주들과 비교분석하였고 phylogenetic tree를 작성하였다.

## 결 과

IBDV 국내분리주와 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region을 RT-PCR로 증폭시킨 다음 염기서열을 결정하였다. 증폭된 cDNA는 474bp로 Bayliss *et al*<sup>12</sup>의 numbering system에 따른 738~1211의 염기에 해당되며, 결정된 염기와 아미노산 서열을 이미 발표된 외국 IBDV와 비교하였다(Fig 1, 2).

염기서열을 기준으로 할 때 310 분리주를 제외한 국내

	747	757	767	777	787	797	827	817	827	837
K1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
K2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....
225	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....
269	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
310	.....	.....	.....C	.....	.....	.....GT	.....C	.....C	.....C	.....C
SH/92	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....
DAE	.....	.....	.....	.....	.....	.....C	.....	.....	.....C	.....C
90-11	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
894VB	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
F9502	.....	.....	.....CC	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....
PB998	.....	.....	.....	.....	.....	.....C	.....	.....	.....C	.....C
BV3	.....	.....	.....	.....	.....	.....C	.....	.....	.....C	.....C
DELE	*****	*****	.....A	.....	.....	.....A	.....	.....	.....C	.....C
STC	.....	.....	.....	.....	.....	.....C	.....	.....	.....C	.....C
CONS	CCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTCTCAGCTAATATCGATG									
	AccI					+			+	+
	847	857	867	877	887	897	907	917	927	937
K1	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
K2	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
225	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
269	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
310	.....C	.....TG	.....T	.....A	.....G	.....C	.....G	.....	.....	.....
SH/92	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DAE	.....	.....G	.....T	.....	.....	.....G	.....	.....	.....C	.....
90-11	.....	.....A	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
894VB	.....C	.....G	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....A	.....
F9502	.....	.....A	.....C	.....G	.....	.....	.....	.....	.....	.....C
PB998	.....	.....G	.....T	.....	.....G	.....	.....	.....	.....C	.....C
BV3	.....	.....G	.....T	.....	.....CA	.....	.....	.....	.....C	.....C
DELE	.....	.....T	.....	.....G	.....	.....CA	.....	.....	.....C	.....C
STC	.....	.....G	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....C	.....C
CONS	CCATCACAAGCCTCAGC-T-GGGGGAGA-CTCGTGTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTTATACTGGGTGCTACCATCTACCTTATAGGCTTTGATGGGAC									
						+			+	+

	947	957	967	977	987	997	1007	1017	1027	1037
K1	G					G				
K2									G	
225									G	
269										
310	CA	G C	T GA	G	C	T C T	C	T	G A	T
SH/92			A							
DAE	AA	G	A	G A	C		C		A A	
90-11										
894VB										
F9502		T					C			
PBG98	AA	G	A C	G A	C		C		A A	
BV3	AA	G	A	G	C	T	C		A	
DELE			A	G	TC	T	C		AT	
STC	A	G		G	C	T	C		A	
CONS	TGCGGTAATCACCAGAGCTGTGGCCGAGACAATGGGCTAACGGCCGGCACTGACAACTTATGCCATTCAATATTGTGATTCCAACCAGCSAGATAACC									
				+	+		+		+	

	1047	1057	1067	1077	1087	1097	1107	1117	1127	1137
K1										
K2										
225	T			T						
269									A	
310	T	G			C C	T	C	G	C	C
SH/92										
DAE	G		A			A		G	A	
90-11										
894VB								TGT		
F9502			C C			C				
PBG98						A	T	G	A	
BV3						A		C	A	
DELE					A	A	A	G		
STC			G		C	A		G		
CONS	CAGCCAATCACATCCATCAAACCTGGAGATAGTGACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGATGTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGA									
										+

	1147	1157	1167	1177	1187	1197	1207
K1	C						
K2	T	C					
225	T						
269							
310	A T T		A	T		T	
SH/92							
DAE	T			G	G		
90-11							
894VB	A T						
F9502							
PBG98	T			G	G		
BV3	T			G			
DELE	T		A				
STC							
CONS	CGATCCACGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGA						
	+						

SpeI

Fig 1. Nucleotide sequence of VP2 from 738 to 1211 (numbering of Bayliss *et al*<sup>12</sup>) of the Korean isolates (K1, K2, 225, 269, 310, SH/92), the Japanese, Belgium, and Chinese very virulent isolates (90-11, 894VB and F9502, respectively)<sup>18-20</sup>, classical virulent strain (STC)<sup>11</sup>, U.S.A. antigenic variant (DELE)<sup>26</sup>, and attenuated strain (DAE, PBG98, BV3)<sup>12,36</sup> compared with consensus (CONS) sequence. A dot indicates a position where the sequence is identical to that of consensus: base changes are indicated. Asterisks (\*) denote sequences not determined. The position of *AclI* and *SpeI* sites, flanking the sequence encoding the protective epitope, are underlined<sup>10,13</sup>. +, Positions where the very virulent isolates differ from all the other strains.

	212	222	232	242	252	262	272	282	292	302
K1							L		V	
K2										
225										
269							T			
310	H	S	A	L	T	T	V	P	S	V
SH/92								S	ST	T
DAE		P			V		H	V	T	N
90-11	*****									
894VB	*****									
F9502	A							R		L
PBG98		P			V	R	H	V	T	NT
BV3	***	P			V	K	V	T	N	L
DELE	***	N	T		V	K	S	V	N	I
STC		P			V		V	F	T	L
CONS	PRVYITITAA	<u>LDYGRSSVYDAG</u>	VITILFSANIDAITSLSIGGELVFQTSVQGLILGATIYILIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNIVIPTSEIT							
		+				+				+

	312	322	332	342	352
K1					
K2					
225	L				
269					
310	T		P	A	
SH/92					
DAE	E		R		
90-11	*****				
894VB	*****				
F9502	PQ	A			
PBG98		L	R		
BV3			R		*****
DELE		D	E		*****
STC	V				
CONS	QPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSAGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG				

Fig 2. Deduced amino acid sequence of VP2 from residues 203-360 (numbering of the segment A polyprotein of Bayliss *et al*<sup>12</sup>) of the Korean isolates (K1, K2, 225, 269, SH/92), the Japanese, Belgium, and Chinese very virulent isolates (90-11, 894VB and F9502, respectively)<sup>18,19,28</sup>, classical virulent strain (STC)<sup>11</sup>, U.S.A. antigenic variant (DELE)<sup>26</sup>, and attenuated strains (DAE, PBG98, BV3)<sup>12,26</sup> compared with consensus (CONS) sequence. A dot indicates a position where the sequence is identical to that of consensus; amino acid changes are indicated. Asterisks (\*) denote a region where the sequence was not determined. The two hydrophilic regions are shaded and the serine rich heptapeptide is underlined. +, Positions where the very virulent isolates differ from all the other strains.

분리주들(K1, K2, 225, 269, SH/92)은 서로 3~9개의 염기 서열만이 달라 98.10~99.36%의 높은 상동성을 나타내었다. 그러나 310 분리주는 다른 국내분리주들과 54~59개의 염기가 달라 87.55~88.60%의 상동성을 나타내었다. 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 외국에서 확인된 vv IBDV와 비교하였을 때 일본 vv IBDV인 90-11과는 3~6개의 염기가, 중국과 벨기에의 vv IBDV인 F9502, 894VB와는 10~16개의 염기가 다른 것으로 나타나 96.13~99.20%의 높은 상동성을 나타내었다.

아미노산 서열을 기준으로 할 때 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 서로 1~3개의 아미노산만이 달라 98.10~

99.36%의 높은 상동성을 보였고 외국 vv IBDV인 90-11, F9502, 894VB 등과 비교하였을 때 K2와 90-11은 동일한 것으로 나타났고 다른 바이러스들은 1~8개의 아미노산이 다른 것으로 나타나 94.93~99.27%의 상동성을 나타내었다.

국내백신주인 DAE는 외국백신주인 PBG98, BV3와 염기서열을 기준으로 할 때 각각 5, 10개의 염기가 다른 것으로 나타났고 아미노산을 기준으로 할 때는 5개의 아미노산이 다른 것으로 나타났고 310 분리주는 다른 국내 분리주들과 아미노산 서열을 비교하였을 때 22(SH/92)~24(225, 269)개의 아미노산이 달랐으며 국내백신주인 DAE

를 포함한 다른 외국 IBDV와는 19(BV3, STC)-29(F9502) 개의 아미노산이 다른 것으로 나타났다.

310 분리주를 제외한 5주의 국내분리주들은 일본, 벨기에, 중국의 vv IBDV로 알려진 90-11, 894VB, F9502 등과 795(G), 827(T), 830(T), 833(C), 897(A), 905(T), 908(T), 977(A), 989(T), 1011(A), 1027(G), 1094(G), 1145(C) 등에서 동일한 염기를 보였다. 위 위치에서 백신주를 포함한 기존의 IBDV들은 모두 다른 염기를 갖는 것으로 나타났다(Fig 1). 이들 12염기의 변화중에서 795(C→G), 897(G→A), 1011(C→A), 1027(A→G) 위치의 염기변화가 아미노산의 변화를 초래하는데 classical strain에서 P(222), V(256), L(294), N(299)이 각각 A, I, I, S로 변하였다.

두 hydrophilic region에서 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 vv 894VB와 동일하였으나 vv F9502와는 4개의 아미노산에서 차이가 나타났다. 310 분리주는 214, 222, 317 위치에서 유일하게 각각 H, S, T를 나타내어 다른 IBDV와 구별되었다. 국내백신주인 DAE는 외국백신주인 PBG98, BV3와 1121(A), 1181(G)에서 동일한 염기를 보여 나머지 IBDV와 구별되었으며 DAE와 PBG98은 890(C), 981(A), 1025(A)에서 추가로 동일한 염기를 나타내어 다른 모든 IBDV와 구별되었다. 아미노산 서열분석에서 DAE, PBG98, BV3등은 331(R)에서 다른 IBDV와는 다른 동일한 아미노산을 보였으며 DAE와 PBG98은 253(H), 284(T)에서 추가로 동일한 아미노산을 가지고 있었다.

모든 병원성 IBDV에서 보존되는 것으로 알려진 SWS-ASGS(326-332)는 310 분리주를 포함한 모든 국내분리주

들에서 보존되어 있었으며 백신주인 DAE는 330 위치에 서 S가 R로 변하였다.

아미노산 서열을 바탕으로 한 phylogenetic tree 구조분석에서 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 서로 밀접한 연관성을 보였고 외국 vv IBDV와 동일한 그룹으로 분류되었다. 백신주인 DAE는 PBG98, BV3 등과 유사한 그룹으로 분류되었다. 310 분리주는 다른 국내분리주를 포함하여 비교대상이 된 모든 IBDV와는 구별되는 독립적인 그룹을 형성하였다(Fig 3).

## 고 찰

IBDV의 외피 구조단백질인 VP2는 주요 숙주방어 항원으로 알려져 광범위한 연구가 이루어져 왔다<sup>10,24</sup>. VP2 sequence는 대부분 보존되어 왔지만 중화항체를 유도하는 부위로 알려진 중심부의 *AccI-SpeI* 분절인 hypervariable region(residues 206~350)에서는 다양한 변이가 관찰되었다<sup>10,13</sup>. IBDV 변이의 유전적인 정보는 대부분 hypervariable region에서 관찰되므로 많은 IBDV주의 염기서열 분석이 이루어졌다<sup>18,19,25,26</sup>. 본 연구에서는 최근 국내에서 분리된 5주의 IBDV, 국내분리주로서 vv IBDV로 확인된 SH/92 그리고 현재 국내에서 사용중인 백신주(DAE)의 hypervariable region을 포함하는 474 nucleotide의 염기서열을 결정하였다(Fig 1).

두 hydrophilic region은 중화 단백질 항체의 결합에 중요한 부위로 중화항체를 유도하는 주요 부분으로 여겨진다<sup>10,27</sup>. 그러므로 이 부분의 변이는 중요한 항원적 변이를 유도하는 것으로 알려져 있다. 첫 번째 hydrophilic region의 222 위치에서 classical virulent strain인 STC와 백신주인 PBG98, BV3는 P, 변이주인 DELE는 T, 국내분리주인 310은 S 그리고 310을 제외한 국내분리주와 외국의 vv IBDV들은 A로 나타났다. 310, F9502, DELE등은 각각 214, 212, 213 위치에서 추가로 아미노산의 변화가 관찰되었다. 두 번째 hydrophilic region에서 국내분리주인 310, 중국 vv IBDV인 F9502, 그리고 변이주인 DELE를 제외한 모든 IBDV의 아미노산 서열은 동일하였다. 이러한 변이는 중요한 항원적 변이를 유도할 것으로 보인다. 특히 중국 vv IBDV인 F9502는 다른 vv IBDV와 다른 아미노산 서열을 가지고 있어 vv IBDV 사이에도 항원적 차이가 있을 것으로 추정된다. Van den Berg *et al*<sup>28</sup>은 벨기에 vv IBDV인 849VB가 다른 vv IBDV를 인지하

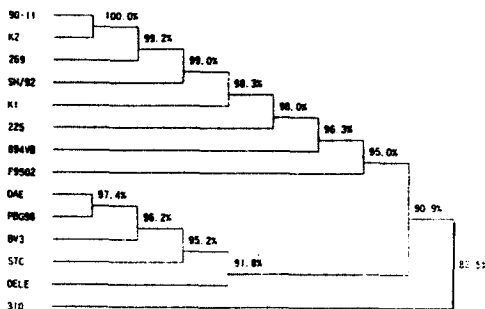


Fig 3. The phylogenetic tree was produced by the DNASIS software(HITACHI) based on amino acid residues 203-360 (numbering by Bayliss *et al*<sup>12</sup>) of the VP2 hypervariable region, displaying the relationships of the Korean and some published IBDV strains(sources stated in Fig 1, 2).

는 Mab 14B5에 의하여 중화되지 않는 것을 관찰하여 vv IBDV 사이에서도 항원적 차이가 있음을 밝혔다. Van den Berg *et al*<sup>17</sup>은 SPF 닭을 대상으로 한 공격실험에서 intermediate IBDV 백신이 mild 백신보다 병원성 IBDV와 항원적으로 밀접한 관련이 있어 방어효과가 우수하다고 보고하였다.

국내분리주인 310은 두 hydrophilic region에서 세 곳의 아미노산(214, 222, 317)이 다른 IBDV와 다른 것으로 나타났다. 대부분의 IBDV 변이주들은 두 hydrophilic region에서 아미노산의 변화가 관찰되었지만 미국에서 분리된 Miss주는 표준주인 STC, PBG98등과 동일한 아미노산을 가지고 있었다<sup>26</sup>. 그러므로 항원형이 표준주와 다른 변이주는 두 hydrophilic region이외에 다른 부위에서 아미노산이 변하여 VP2의 구조적인 변이를 유도하여 항원적 변이를 일으키는 것으로 보인다<sup>29</sup>. Dormitorio *et al*<sup>26</sup>은 249(Q), 254(S)를 갖는 Miss 변이주를 제외한 Ark, Ga, Del-E, GLS, DS326, DelA 변이주 등은 모두 249(K), 254(S)를 갖는다고 보고하였다. 249 아미노산은 바이러스 중화항체(MAb B69)가 결합하는데 중요한 곳으로 보이는데 249(Q)가 249(K)로 변한 E/Del, GLS, DS326 변이주 등은 바이러스 중화항체와 결합하지 못하였다<sup>15</sup>. 국내분리주인 310은 249(Q)와 254(S)를 가지고 있었는데 이와같은 특징과 두 hydrophilic region에서의 특징적인 변이는 이 바이러스가 표준 IBDV와는 다른 특성을 갖는 변이주일 가능성을 제시하고 있다. 앞으로 항원적 특성 규명 등에 관한 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Serine-rich heptapeptide인 SWSASGS는 병원성 IBDV에서 보존되는 것으로 알려져 있다<sup>18,25</sup>. 그러나 일본의 vv IBDV로부터 유래한 attenuated strain에서도 이 부위가 보존되었다<sup>30</sup>. IBDV의 attenuated strain은 279(D→N)와 284(A→T)에서 아미노산의 변화가 공통적으로 확인되어 이 부위가 IBDV의 병원성과 관련이 있음을 암시하고 있다. 6주의 국내분리주는 모두 SWSASGS가 보존되어 있었다. 그러나 백신주인 DAE는 330(S)가 다른 백신주인 PBG98, BV3와 같이 330(R)로 변하였다. 279 위치에서 국내백신주인 DAE와 외국백신주인 PBG98, BV3 등은 279(D)가 279(N)으로 변하였지만 SWSASGS가 보존된 310, SH/92, DELE 등도 279(N)으로 나타나 이 부위의 변화는 attenuated strain만의 특성은 아닌 것으로 보인다. Yamaguchi *et al*<sup>30</sup>은 일본 vv IBDV로부터 유래한 attenuated strain에서 279(D)가 그대로 보존되어 있다고 보고하

였다. 284 위치에서 DAE와 PBG98은 284(A)가 284(T)로 변하였지만 standard intermediate 백신인 BV3는 다른 IBDV와 같이 284(A)로 나타났다. 이상의 결과로 보아 SWSASGS heptapeptide에서의 변화와 두 아미노산(279, 284)의 변화가 IBDV의 병원성 감소와 밀접한 연관이 있는 것으로 보인다.

아미노산을 기준으로 한 phylogenetic tree 분석에서 310을 제외한 국내분리주들은 외국 vv IBDV들과 한 그룹으로 분류되었다(Fig 3). 특히 국내분리주 K2는 일본 vv IBDV인 90-11과 hypervariable region이 완전히 동일한 것으로 나타났고 이 그룹의 나머지 바이러스들도 1-8개의 아미노산만이 다른 것으로 나타났다. 지리적으로 원거리에 위치하였음에도 불구하고 외국에서 분리된 vv IBDV와 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 염기와 아미노산 서열 비교결과 매우 유사한 것으로 나타났다<sup>28, 29, 20, 25</sup>. 국내분리주인 SH/92는 5, 7주령의 SPF 닭에서 80%의 폐사율을 나타내어 vv IBDV로 분류되었다<sup>21</sup>. 310 분리주를 제외한 나머지 국내분리주들(K1, K2, 225, 269)은 병원성 실험을 하지는 않았지만 SH/92, 외국 vv IBDV와 염기, 아미노산 서열이 유사한 것으로 나타나 vv IBDV 추정된다. 이들의 기원은 불확실하지만 비슷한 기원으로부터 유래하였을 것으로 보인다. 이들 vv IBDV에서 222(A), 256(I), 294(T)는 지금까지 확인된 모든 vv IBDV에서 동일하였다. 따라서 이들 아미노산의 변화가 비연속적인 중화 결정인자에 실질적인 구조적인 변화를 유도하여 vv IBDV의 병원성을 증가시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다<sup>19</sup>. 229 위치에서 대부분의 vv IBDV는 S를 나타내지만 attenuated strain인 002-73도 S를 나타내어 229(S)는 vv IBDV를 특징짓는 아미노산은 아닌 것으로 나타났다<sup>25</sup>. 310 분리주의 경우 염기, 아미노산 서열 비교분석에서 예상했듯이 다른 바이러스들과 구별되는 독립적인 그룹을 형성하여 이 바이러스의 생물학적, 유전적인 특성을 추가적으로 확인하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 국내에도 vv IBDV로 확인된 SH/92를 비롯하여 vv IBDV로 추정되는 다수의 IBDV가 확인되어 이 바이러스에 의한 질병 예방에 주의하여야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

국내에서 분리된 IBDV 6주(K1, K2, SH/92, 225, 269, 310)와 백신주(DAE)의 VP2 gene의 hypervariable region을 RT-PCR로 증폭시킨 후 염기서열을 결정하고 외국 IBDV와 비교하였다. 아미노산 서열을 기준으로 할 때 국내분리주 K1, K2, SH/92, 225, 269 등은 외국 vv IBDV와 94.93~100%의 유사성을 나타내었다. 국내분리주인 310주는 다른 국내분리주와 84.31~86.70%의 아미노산 유사성을 나타내었다. Attenuated strain인 DAE는 다른 attenuated strain과 같이 279(D→N)와 284(A→T) 그리고 serine-rich heptapeptide 부위에서 아미노산의 변화가 있었다. 310 분리주를 제외한 K-IBDV들은 외국 vv IBDV와 같이 222(A), 256(I), 294(T)에서 표준주나 병원성을 약화시킨 주와는 다른 특이 아미노산을 가지고 있었다. 두 hydrophilic region에서 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 벨기에 vv IBDV인 894VB와 동일한 아미노산 서열을 나타냈으나 중국 vv IBDV인 F9502와는 네 개의 아미노산이 다른 것으로 나타났다. 310 분리주의 경우 염기와 아미노산 서열이 다른 국내분리주, 백신주 또는 외국분리주들과 크게 다른 것으로 나타나 이들과는 다른 계통으로부터 유래한 것으로 보인다. 병원성 IBDV에서 보존되는 것으로 알려진 SWASASGS heptapeptide는 모든 국내분리주에서 보존되었다. Phylogenetic tree 분석결과 310 분리주를 제외한 국내분리주들은 외국 vv IBDV 분리주들과 같은 그룹으로 분류되었고 310 분리주는 비교한 모든 IBDV와는 다른 독립적인 그룹으로 분류되었다.

## 참 고 문 헌

- Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: Disease of poultry, 10th ed., Calnek, BW *et al.*, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp.721-738, 1997.
- McFerran JB, McNulty MS, McKilhop ER, *et al.* Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of second serotype. *Avian Patho*, 9:395-404. 1980
- Winterfield RW, Thacker HL. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease virus applied as vaccines. *Avian Dis*. 5:253-260, 1978.
- Isamail NM, Saif YM, Moorhead PD. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 32:757-759, 1988.
- Murphy FA, Fauquier CM, Bishop DHL. *Virus taxonomy*. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, New York (Arch. Virol. Suppl. 10). pp.240-244, 1995.
- Muller H, Becht H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol*, 44: 384-392, 1982.
- Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*, 76:437-443, 1995.
- Hudson PJ, McKern, NM, Power BE, *et al.* Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, 14:5001-5012, 1986.
- Becht H, Muller H, Muller HK. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 59:631-640, 1988.
- Heine HG, Haritou M, Failla P. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strain. *J Gen Virol*, 22:1835-1843, 1991.
- Kibenge FSB, Jackwood DJ, Mercado CC. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 712:569-577, 1990.
- Bayliss CD, Spies U, Shaw K, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 71:1303-1312, 1990.
- Azad AA, Jagadish MN, Brown MA. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virol*, 161:145-152, 1987.
- Lana DP, Beisel CF, Silva RF. Genetic mechanisms of



- antigenic variation in infectious bursal disease virus : analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Gene*, 3:247-259, 1992.
15. Vakharia VN, He J, Ahmad B. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res*. 31:265-273, 1994.
  16. Chettle N, Stuart JC, Wyeth PJ. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Angila. *Vet Rec*, 125: 271-272, 1989.
  17. Van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry : isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Patho*, 20: 133-143, 1991.
  18. Lin Z, Kato A, Otaki Y, *et al*. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*, 37:315-323, 1993.
  19. Cao YC, Yeung WS, Law M, *et al*. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus : classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*, 42:340-351, 1998.
  20. Pitcovski J, Goldberg D, Levi BZ. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV-comparison with isolates from different countries and virulence. *Avian Dis*. 42:497-506, 1998.
  21. 권용국, 모인필, 성환우 등. 전염성 F낭염 바이러스 국내 분리주 SH/92의 병원성 연구. 농업논문집, 37: 637-647, 1995.
  22. Rosenberger JK. Infectious bursal disease. In : *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 3rd ed., Purchase HG *et al*, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa. pp.165-166, 1989.
  23. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
  24. Azad AA, Barret SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 143: 35-44, 1985.
  25. Brown MD, Green P, Skinner MA. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol*, 75:675-680, 1994.
  26. Dormitorio TV, Giambone JJ, Duck LW. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis*, 41: 36-44, 1997.
  27. Schnitzler D, Bernstein F, Muller H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 74:1563-1571, 1993.
  28. Van den Berg TP, Gonze M, Morales D. Acute infectious bursal disease in poultry : immunological and molecular basis of antigenicity of highly virulent strain. *Avian Patho*, 25:751-768, 1996.
  29. Van den Berg TP, Morales D, Gonze M. Relevance of antigenic variation for protection in infectious bursal disease. Proc. *International Symposium on infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia*. Rauschhozhausen, Germany. pp.22-36, 1994.
  30. Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology*. 223:219-223, 1996.