

한국영아에서 분리된 로타바이러스의 VP7 유전자형 및 염기서열 분석

중앙대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실¹, 충북대학교 수의과대학 미생물학교실²,
(주) 녹십자 종합연구소³

송미옥 · 윤여란 · 정상인 · 최철순 · 임인석¹ · 강신영² · 안창남³ · 김원용*

=Abstract=

Typing and Sequence Analysis of the VP7 Gene of Rotavirus Isolated from Infants in Korea

Mi-Ok Song, Karyn Yun, Sang-In Chung, Chul-Soon Choi, Inseok Lim¹,
Shien-Young Kang², Chang-Nam An³ and Won Yong Kim*

Department of Microbiology, ¹Department of Pediatrics, Chung-Ang University
College of Medicine, Seoul 156-756, ²College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ³Central Research Institute,
Korea Green Cross Corporation, Yongin 449-900, Korea

Rotaviruses are the most common cause of severe vomiting and diarrhea in children worldwide and classified as a genus in the family *Reoviridae*. Rotavirus has eleven segmented dsRNAs and the virion consists of three shells. Outer capsid VP7 and VP4 induce neutralizing antibodies and are classified into G types (glycoprotein VP7) and P types (protease-sensitive VP4). Characterization of VP7 gene of Korean isolates of human rotavirus was performed using multiplex PCR and nucleotide sequence analysis. After RT-PCR amplification of full length (1,062 bp) of VP7 genes, the amplified PCR products were G typed by multiplex PCR and the nucleotide sequences were compared with those of reference rotavirus from GenBank. The G type analysis revealed that 25% (2/8) belong to G1, whereas 37.5% (3/8) belong to G2 and G4, respectively. The Korean isolates within the same serotypes showed high homology of nucleotide sequences and could be discriminated from foreign isolates exception with two strains (CAU009 and CAU022). But Korean isolates CAU009 and CAU022 were close related into Japanese isolates 417 (99.2%) and Indian isolates (97.6%) than Korean isolates. Our results showed that these two strains were supposed to be originated from abroad. As a result, The G typing and nucleotide sequence analysis of VP7 gene of rotavirus isolated from infants in Korea could be used for identification, serotyping and determination of novel or unusual strains of rotaviruses.

Key Words: Rotavirus, VP7, G typing, Sequence

접수 : 2000년 3월 18일, 논문게재확정 : 2000년 5월 8일

*; Address for correspondence: 김원용, 156-756, 서울특별시 동작구 흑석동 221번지 중앙대학교 의과대학 미생물학교실,
Tel 02-820-5685, Fax 02-812-5495, e-mail kimwy@cau.ac.kr

서 론

로타바이러스 (Rotavirus)는 영유아뿐만 아니라 많은 포유동물과 조류 등 어린동물의 비세균성 위장염의 주요 원인체이다 (2,9). 로타바이러스는 *Reoviridae*과에 속하는 noneveloped RNA 바이러스로서 두 가닥 RNA 11개 절편과 캡시드 단백질 3층으로 구성되어 있다. 로타바이러스는 혈청학적인 방법에 의해 중간 캡시드인 VP6에 따라 A-G의 7개 혈청군 (Group)으로 나누어지며 (5), 이 중 A군 로타바이러스가 세계적으로 가장 많은 부분을 차지하고 있다 (4). A군 로타바이러스는 외각 캡시드 단백질인 VP4와 VP7의 조성을 근거로 세분류된다. 이 두 단백질은 서로 다른 유전자로부터 형성된 독립적인 단백질로 VP7에 의한 G형 (Glycoprotein)과 VP4에 의해 결정되는 P형 (Protease-cleaved protein)이 있다. 현재까지 밝혀진 G 혈청형은 14개로서 이중 10개는 사람에서 분리되었고 G1-4가 전세계적으로 영유아에게 설사증을 유발하는 것으로 알려져 있다.

로타바이러스의 typing은 electropherotype, hybridization, monoclonal antibody (MoAb)를 이용한 ELISA, type-specific primer를 사용한 multiplex PCR 및 염기서열 분석 등으로 결정된다. 이 중 ELISA와 multiplex PCR이 가장 보편적으로 사용되고 있으나 ELISA의 경우 각 형에 대한 MoAb를 입수하기가 어려우며 multiplex PCR도 몇 가지 제한된 형 (G1-4, 8, 9)의 구별만이 가능하다. 또한 RNA 단편들의 빈번한 교환으로 유전자 재조합과 유전자 재배열이 발생된 변이형 로타바이러스가 보고되어 형결정에 어려움을 더해 주고 있다 (8).

본 연구는 국내에 유행하는 로타바이러스의 유전자적 특성을 조사하기 위한 기초연구로서 국내

설사환아 중 로타바이러스 양성판정을 받은 분변 시료로부터 로타바이러스에서 가장 중요한 면역원성을 나타내는 VP7 외각 캡시드 단백질 유전자형을 multiplex PCR로 결정하였으며 그 염기서열을 조사함으로써 국내분리주간의 상동성 및 외국분리주와의 유전적 상관관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 로타바이러스 및 RNA 분리

본 연구에서 사용한 로타바이러스는 중앙대학교 용산병원 소아과와 이대 목동병원 소아과에 설사증을 주 증상으로 내원한 환아의 분변을 CAU로 번호를 부여하였다 (Table 1). 먼저 VP6 MoAb 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)으로 로타바이러스의 감염유무를 확인한 다음 양성의 결과를 나타낸 시료 8개로부터 Gentsch 등 (6,7)의 방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA pellet은 DEPC처리 증류수 20 µl를 가하여 50℃에서 10분 동안 용해한 후 실험에 사용하였다.

2. Primer

로타바이러스 VP7 전체 유전자를 증폭시키기 위한 RT-PCR primer와 혈청형결정을 위한 Multiplex PCR primer는 Gouvea 등 (10)의 염기서열을 참조하여 합성하였다. 염기서열 분석을 위한 primer로서 VP7의 양쪽 말단 부분은 vector에 위치한 M13 forward와 M13 reverse를 사용하였으며 VP7 유전자의 중앙부분은 분리주의 염기서열에 따라 oligo 5.0 primer analysis 프로그램 (LifeScience Software Resource, Long Lake, MN, U.S.A.)을 이용하여 제작하였다. 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

Table 1. Rotavirus samples used in this study

Samples	Sex	Age (month)	Date of sample collection	ELISA results
CAU-003	male	-	Dec.1998	Positive
CAU-009	female	8	Dec.1998	Positive
CAU-020	male	9	Mar.1998	Positive
CAU-022	female	1	Mar.1998	Positive
CAU-029	-	-	-	Positive
CAU-033	female	15	Jun.1998	Positive
CAU-034	female	16	Jun.1998	Positive
CAU-035	male	11	Jun.1998	Positive

Table 2. Primer sequences

Primer nomenclature	Oligonucleotide sequence (5'→3')	RT-PCR	Typing	Sequencing
Beg9	5'-GGCTTTAAAAAGAGAGAATTTCGGTCTGG-3'	○		
End9	5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'	○		
RVG9	5'-GGTCACATCATACAATTCT-3'		○	
aAT8	5'-GTCACACCAATTTGTAAAATTCG-3'		○	
aBT1	5'-CAAGTACTCAAATCAATGATGG-3'		○	
aCT2	5'-CAATGATATTAACACATTTTCTGTG-3'		○	
aDT4	5'-CGTTTCTGGTGAGGAGTTG-3'		○	
aET3	5'-CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG-3'		○	
aFT9	5'-CTAGATGTAACACTACAACACTAC-3'		○	
M13 forward	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'			○
VP7-SEQ.1	5'-TGAGGACGCAAATTACGGC-3'			○
VP7-SEQ.2	5'-TCCATCAGAAGCTCCAAC-3'			○
VP7-SEQ.3	5'-ACCAATTTTTCAGACGAGGC-3'			○
VP7-SEQ.4	5'-GCCAATTTTTCGCTATCAGC-3'			○
VP7-SEQ.5	5'-TATCCAAGCAAGTAC-3'			○
M13 reverse	5'-GTCATAGCTTTTCTG-3'			○

M13 forward/reverse: all samples

VP7-SEQ.1: CAU-033, CAU-034; VP7-SEQ.2: CAU-020, CAU-029; VP7-SEQ.3: CAU-022; VP7-SEQ.4: CAU-035; VP7-SEQ.5: CAU-003, CAU-009

3. 효소중합반응

로타바이러스 VP7 단백을 지배하는 cDNA의 합성은 Gouvea 등 (10)의 방법에 따라 수행하였다. 먼저 추출한 바이러스 이종나선 RNA (4~40 ng)에 DMSO (Sigma Co., USA) 7%를 가하고 100℃에서 5분간 가열하여 변성하였다. 여기에 반응액으로 10X Taq buffer, 0.2 mM 각 dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 μM Beg9 primer, 1 μM End9 primer 및 4 U AMV reverse transcriptase (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)와 2.5 U Taq polymerase (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)를 가하고 42℃에서 30분간 반응하여 first strand cDNA를 합성하고 94℃에서 1분, 42℃에서 2분, 72℃에서 1분 반응을 25회 반복한 다음 마지막으로 72℃에서 7분 반응하여 VP7 유전자를 증폭하였다. Multiplex PCR를 이용한 유전자형 결정은 증폭시킨 VP7 cDNA (0.2~20 ng)에 10X Taq buffer, 0.2 mM 각 dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM 각 primer mixture 및 1 U Taq polymerase (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)를 가하고 94℃에서 1분, 42℃에서 2분, 72℃에서 1분 반응을 15회 반복한 다음 마지막으로 72℃에서 7분 반응하였다. 총 반응량은 100 μl로 하였다.

4. cDNA Cloning

로타바이러스 VP7 유전자 염기서열의 분석을 위하여 RT-PCR로 증폭한 VP7 유전자는 pGEM-T Easy vector (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)에 제품의 지침서에 따라 클로닝하였다.

5. 염기서열 결정 및 분석

로타바이러스 CAU주들의 VP7 cDNA 염기서열 분석은 Perkin-Elmer Biosystem사의 automatic sequencer 310으로 수행하였다. 국내분리주들의 VP7 유전자 염기서열은 Sequence Navigator (Perkin-Elmer Applied Biosystem, Foster city, CA, U.S.A.), Clustal W, Pairpro 및 Todot 등의 프로그램을 이용하여 미국 NCBI GenBank에 보고된 외국 로타바이러스와 VP7 유전자의 상동성, 분자진화도 및 계통수를 작성하였다.

결 과

1. RT-PCR

국내 환자의 분변으로부터 로타바이러스의 VP7 단백 유전자를 RT-PCR을 이용하여 증폭한

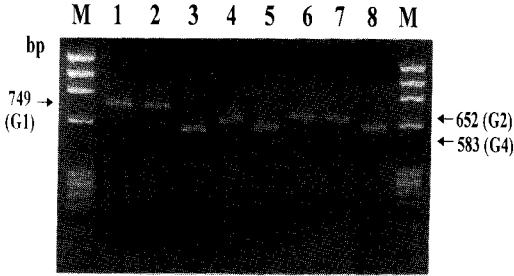


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of representative 583 bp (G4), 652 bp (G2), and 749 bp (G1) of PCR products with multiplex PCR primers. M: Φ X174-Hae III; Lane 1: CAU-003; Lane 2: CAU-009; Lane 3: CAU-020; Lane 4: CAU-022; Lane 5: CAU-029; Lane 6: CAU-033; Lane 7: CAU-034; Lane 8: CAU-035.

후 2 μ l의 PCR product를 취하여 1% agarose gel에서 전개하고 ethidium bromide로 염색한 결과 1,062 bp 크기의 VP7 gene이 증폭되었다.

2. Multiplex PCR

국내 로타바이러스들의 형결정을 위하여 VP7 cDNA로부터 multiplex PCR을 수행하고 2 μ l의 PCR product를 취하여 1% agarose gel에서 전개하고 ethidium bromide로 염색한 결과 Figure 1에서와 같이 583 bp, 652 bp 및 749 bp의 products가 증폭되었다. 국내주들의 형은 CAU-003과 009는 749 bp의 G1, CAU-022, 033 및 034는 652 bp의 G2, CAU-020, 029 및 035는 583 bp의 G4이었다.

3. 염기서열 분석

국내 로타바이러스의 VP7 단백 유전자의 변이를 조사할 목적으로 VP7 단백 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하여 GenBank에 보고된 외국주와 비교한 결과 VP7 유전자는 G7 혈청형을 제외한 A군 로타바이러스와 동일한 크기인 1,062 bp를 나타내었다. A군 로타바이러스의 염기서열은 서로 다른 혈청형간에는 어느 정도의 차이가 있었으나 같은 혈청형 사이에서는 그 염기서열에 변화가 거의 없었다. 이것은 neutralizing epitopes로 간주되는 3부분 310~318 bp, 484~501 bp, 673~714 bp의 염기서열 비교로 확인할 수 있었다. 또한 multiplex PCR에서 type이 결정된 국내분리주의 type-specific region인 314~335 bp (G1), 411~435 bp (G2), 480~498 bp (G4)의 염기서열을 조사한 결과 각 혈청형내의 국내분리주 모두 동일한

염기서열이었으나 type-specific primer의 염기서열과 2개 또는 3개 염기가 서로 일치하지 않았다. 국내분리주들의 VP7 유전자는 염기서열의 5'말단 49~51 bp와 136~138 bp에서 시작되어 1027~1029 bp에서 종결되는 2개의 open reading frame (ORF)를 가지고 있었으며, 각각 326개와 286개로 구성된 아미노산 서열을 코딩하고 있었다. 49~51 bp에 위치하는 처음 개시코돈인 ATG는 A군 모두에서 불변이었으나 136~138의 2차 개시코돈인 ATG는 G7에서만 GCT와 GAT이었다 (Figure 2).

4. 수상도 분석

국내분리주와 GenBank에 보고된 외국분리주간의 상관관계를 조사하기 위하여 njplotWin95으로 수상도를 작성한 결과 Figure 3에서와 같은 dendrogram을 얻었다. 국내분리주는 모두 Group A에 속하였으며 CAU-020, CAU-029 및 CAU-035는 G4인 Gottfried와 같은 군으로 CAU-003과 CAU-009는 G1인 417 및 WA와 CAU-022, CAU-033 및 CAU-034는 G2인 TMC-II, KUN 및 95B와 같이 분류되었다. 따라서 CAU-020, CAU-029 및 CAU-035는 G4와 높은 상관관계를 가지고 있으며 CAU-003과 CAU-009는 G1과 CAU-022, CAU-033 및 CAU-034는 G2와 상관관계가 높음을 알 수 있었다. 각 혈청형별로는 G1과 높은 상관성을 가진 CAU-009는 같은 국내분리주 CAU-003이나 미국유래 WA주보다 일본유래 417와 더 밀접한 관계를 갖고 있었다. G2에서는 CAU-022가 CAU-033, CAU-034보다 인도분리주 253과 더 유사하였으며 G4와 함께 분류된 CAU-020, CAU-035 및 CAU-029는 G4의 genetic variation으로 보고되었던 pv5249와 유전적으로 더욱 밀접하였다.

5. 염기서열 상동성 분석

유전자의 상동성을 비교하기 위해 CAU주를 GenBank에 등록된 외국주와 다중정렬하여 수치로 나타내었다 (Table 3). 상동성은 37.3%에서 99.8%까지의 범위를 가지고 있었으며 phylogenetic tree에서 함께 분류되어 유전적으로 상관관계가 밀접했던 주들은 모두 88% 이상의 상동성을 보였다. Phylogenetic tree에서 G1으로 분류되었고 CAU-003보다 일본유래 417주와 더 밀접함을 보였던 CAU-009는 417과 97.6%와 CAU-003과 99.2%의 상동성을 가짐으로써 일본유래주와 훨씬 유연관계가 높음을 알 수 있었다. 또한 G2에 속하던 CAU-022도

Mi-Ok Song, *et al.*: Type and Sequence of Rotavirus VP7 Gene

	49-51bp First start codon	136-138bp Second start codon	309bp	351bp
CAU-022	~ CTTTTTAATGATATGGTA	~ TAACACGATGGACTATA	~ AGAAGCTAAAAATGAGATTCAGATAATGAATGGGAAAACTC	~
253	~	~ T	~	~
CAU-033	~	~ T C	~	~
CAU-034	~	~ T C	~	~
TMC-11	~	~ T C	~	~ G
KUN	~ G	~ T C	~	~ G
95B	~	~ T A C	~	~ G
CAU-003	~ C G	~ CCGA TA C	~ T A G GC C A CAGT GG A G CT AT	~
CAU-009	~ C G	~ CCGA TA C	~ T A G GC C A CAGT GG A G CT AT	~
417	~ C G	~ CCGA TA C	~ T A G GC C A CAGT GG A G CT AT	~
WA	~ C	~ CGA TA C	~ T A G GC C A CAAT GG C A G CT AT	~
SA11	~ C	~ GA TA G	~ T G GGC C A AAAC TC A G C A	~
L338	~ C	~ GAG TC	~ T TAGT G AT GAAT G TC A G C A	~
YO	~ C	~ GA TA T	~ T AGC CA A AAAT TC GG A	~
Gottfried	~ C	~ G A T	~ T G CCG C C A AAT A G C A	~
CAU-020	~ C	~ A G TA	~ CC C C A AGT C C A G A	~
CAU-029	~ C	~ A G TA	~ CC C C A AGT C C A G A	~
CAU-035	~ C	~ A G TA	~ CC C C A AGT C C A G A	~
pv5249	~ C	~ A G TA	~ CC C C A AGT C C A G A	~
B37	~ C	~ C GA TC C	~ AG G CA AG C TCG A GG T	~
Mc35	~ C	~ GA T T	~ G CA A AAAC C ACG G AT	~
YM	~ C	~ A GG A TC	~ C AGC C C G T G CA A G	~
116E	~ C	~ GTG A T	~ T ATC C C A GGG C CA A GG T	~
L26	~ C	~ GT T T	~ TTC T CG C A AA T CCCC T ACGC A	~
OSU	~ C	~ GA A T	~ T AGCT CA A G CAA AC G A A T	~
UK	~ C	~ G GA TA	~ T G ATC A GG T CC A G CT	~
IND	~ C	~ A GAGTA	~ T G ATC C A AG T C A G C T	~
PO-13	~ TG A A	~ A T GCTA T CAC	~ T AG C C A AAAT C C A GG C GG	~
CH2	~ TG AA A	~ GA AAGAT T A	~ CT AG T C A G CCA G A GCGG AG	~
Adult	~	~	~ T CCA C GC C CA A TTA TGG A T	~
Bovine	~	~	~ T C C GCT G CTGGAAT TG AGT TC CG C ACT	~
E93	~ T A A GT T	~ T AC GAT T	~ TA T CG TGGAC TT GAAT GG A T AT C C G A	~
Porcine	~ T A A GT T	~ T T CGACAGC AC	~ TA GA AG TGGAT TC AAAT GGCA T AC CTC A A	~

	411bp	435bp	477bp	504bp	672bp	711bp
CAU-022	~ CAATGA-TATTACTACATTTTCTATG	~	~ ATATGATAATACATCTGAATTAGATGC-	~	~ AATACGAAACGTGGATACATTTGAGATGTTGCCCTGCTCG	~
253	~	~	~	~	~ C G	~
CAU-033	~	~	~	~	~ C G	~
CAU-034	~	~	~	~	~ C G	~
TMC-11	~	~	~	~	~ C AG T A	~
KUN	~	~	~	~	~ C AG A	~
95B	~ C C	~ C	~ G	~	~ C G T AG	~ A G
CAU-003	~ TCAA GT GAT CG T	~ G C A ATCT C AT	~ G C A ATCT C AT	~ CA T A CT A CA TGAAAA	~	~ CA T A CT A CA TGAAAA
CAU-009	~ TCAA GT GAT CG T	~ G C A ATCT C AT	~ G C A ATCT C AT	~ CA T A CT A CA TGAAAA	~	~ CA T A CT A CA TGAAAA
417	~ TCAA GT GAT CG T	~ G C A ATCT C AT	~ G C A ATCT C AT	~ CA T A CT A CA TGAAAA	~	~ CA T A CT A CA TGAAAA
WA	~ TCAA GT GAT G T	~ CC A GTCT AT	~ CC A GTCT AT	~ CA A A CT A CA TGA AA	~	~ CA A A CT A CA TGA AA
SA11	~ T C A C G AT G G T	~ CGGG G TGG G AT	~ CGGG G TGG G AT	~ CA TG T CTACA T AGAA GA AG	~	~ CA TG T CTACA T AGAA GA AG
L338	~ G C C AG AT C C A A	~ AG CCGA CTAG C AT	~ AG CCGA CTAG C AT	~ CA TG TACA G GAA A A A TA	~	~ CA TG TACA G GAA A A A TA
YO	~ T C A C G AT G G T	~ C CCG CTGC C G CAT	~ C CCG CTGC C G CAT	~ CA TG TACA C G C AGAA AA AG	~	~ CA TG TACA C G C AGAA AA AG
Gottfried	~ TTCAA G TTGA C C C	~ TC C TC GG GAA GC AT	~ TC C TC GG GAA GC AT	~ CG TACT C T A CA TGACAG	~	~ CG TACT C T A CA TGACAG
CAU-020	~ TTCAA CG TTGA C C C	~ G TC C TC GGTGAG G CAT	~ G TC C TC GGTGAG G CAT	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC	~	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC
CAU-029	~ TTCAA CG TTGA C C C	~ G TC C TC GGTGAG G CAT	~ G TC C TC GGTGAG G CAT	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC	~	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC
CAU-035	~ TTCAA CG TTGA C C C	~ TC C TC GGTGAG G G CAT	~ TC C TC GGTGAG G G CAT	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC	~	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC
pv5249	~ TTCAA CG TTGA C C C	~ TC C TC GGTGAG G G CAT	~ TC C TC GGTGAG G G CAT	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC	~	~ CG A TACA C T A CA TGATAGC
B37	~ T CA G G T C C A	~ A CCG AT A G AT	~ A CCG AT A G AT	~ CC G TACTACA T AGAA AA AG	~	~ CC G TACTACA T AGAA AA AG
Mc35	~ G C C AG T C C G A	~ C A TCG GT TA C AT	~ C A TCG GT TA C AT	~ CC TACTAGA AGAA G AA AG	~	~ CC TACTAGA AGAA G AA AG
YM	~ T CA G AT CG A	~ C GGA AT AC C AT	~ C GGA AT AC C AT	~ C TCGCAACA C GAA A T AG A	~	~ C TCGCAACA C GAA A T AG A
116E	~ T CC CG T A C	~ A TCA TA G AT	~ A TCA TA G AT	~ C A TAC CG AGAG A GA AAC	~	~ C A TAC CG AGAG A GA AAC
L26	~ TGC C AG CT C G A	~ C CCG T TCG C G AT	~ C CCG T TCG C G AT	~ CA CG C C CA AGAA A AAACG C	~	~ CA CG C C CA AGAA A AAACG C
OSU	~ TGCA G GT G A	~ GGA AT CAG G CAT	~ GGA AT CAG G CAT	~ C AG A AA T A CA G AATG A	~	~ C AG A AA T A CA G AATG A
UK	~ T C AG GG T AG A	~ TC CAG C AT	~ TC CAG C AT	~ TA C TCCA C G A CA GA AA G	~	~ TA C TCCA C G A CA GA AA G
IND	~ T C AG GG T AG A	~ TC CAG C AT	~ TC CAG C AT	~ TA T TCCA C G A CA GA AA G	~	~ TA T TCCA C G A CA GA AA G
PO-13	~ GCG T C GAGT G A AT	~ C A CCG GTG C CAT	~ C A CCG GTG C CAT	~ CA TG T CA G ACAAC GA AG TA	~	~ CA TG T CA G ACAAC GA AG TA
CH2	~ TC A CT GGTG C A AT	~ T CACG CGATGTG CG G CAT	~ T CACG CGATGTG CG G CAT	~ C T TACT A T GA GAT	~	~ C T TACT A T GA GAT
Adult	~ TC CC G GTA GA ATAA	~ G TT AACGC CA G	~ G TT AACGC CA G	~ C CAACTTCT C ACTTCGAAA AT A TGG	~	~ C CAACTTCT C ACTTCGAAA AT A TGG
Bovine	~ T CCA C G TGTG GATAT A	~ CG C AGC A A G TTC	~ CG C AGC A A G TTC	~ CCGA TAAAT G A TTTCAT GT AG AA	~	~ CCGA TAAAT G A TTTCAT GT AG AA
E93	~ T CAC GACA CAG T A AA T	~ GGC AA T C G T	~ GGC AA T C G T	~ CCGG TGTACA A T A AG AT AAATGACA	~	~ CCGG TGTACA A T A AG AT AAATGACA
Porcine	~ CAA AGTC CAG TT G AG T	~ CC G C A A T C G T C	~ CC G C A A T C G T C	~ CCGAG T G ACT A A A AG AT AT AAATGA A	~	~ CCGAG T G ACT A A A AG AT AT AAATGA A

Figure 2. Nucleotide sequence multialignment of CAU isolates with rotaviruses sequence from GenBank. A dot (.) represents an identical residue to CAU-022 and a dash (~) is a gap. Dim shaded boxes are type-specific primer binding sites and dark shaded boxes are changed bases within same serotype.

송미옥 등: 로타바이러스 VP7 유전자 형별 및 염기서열



Figure 3. Phylogenetic relationships based on the nucleotide sequence of VP7 gene.

인도유래 253주와 98.7%, CAU-033과는 97.1%, CAU-034와 97.3%의 상동성을 나타내어 CAU-022도 인도 253과 더 가까움을 알 수 있었다. G4로 함께 분류되었던 CAU-020, CAU-029, CAU-035는 phylogenetic tree에서는 차이가 없었으나 CAU-020을 기준으로 CAU-029와 99.6%, CAU-035와 99.5%로 거의 차이가 없었으며 CAU-029와 CAU-035는 99.3%의 사이관계를 알 수 있었다.

6. 아미노산 분석

VP7 단백 유전자의 neutralizing epitope과 type-

specific region으로 알려진 부분이 염기서열 분석 결과 2개 또는 3개 염기의 차이를 보임으로서 이 부분의 확인을 위하여 아미노산 서열을 분석하였다 (Figure 4). 아미노산 서열의 변화도 같은 혈청형내에서 2개 또는 3개의 아미노산만이 변이하였다. 특히 국내분리주들은 외국유래주들과 비교했을 때 높은 상동성을 갖는 주들과 동일한 아미노산의 변이를 나타냈었다. CAU-033는 90번째 아미노산 S (Ser)가 R (Arg)으로 CAU-009은 124번째 아미노산 T (Thr)가 M (Met)으로, 208번째 아미노산 Q (Gln)가 L (Leu)로 치환되었다. CAU-022는

Table 3. A comparison of identifications on VP7 gene nucleotide sequences of Korean isolates with foreign strains from GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
CAU003]	-	97.6	77.2	74.0	77.2	74.3	74.5	77.1	74.1	77.0	92.4	97.1	74.0	75.1	73.6	76.2	76.2	78.0	75.7	75.5	75.1	65.5	66.7	72.9	76.1	75.9	75.8	75.7	74.0	52.3	55.2	56.2	54.0		
CAU009]	97.6	-	77.0	73.8	77.0	74.1	74.3	76.9	74.0	76.9	92.2	99.2	73.5	74.9	73.2	76.4	76.0	77.9	75.4	74.7	74.7	64.8	65.9	72.7	76.3	74.9	75.6	75.4	73.9	53.6	55.3	56.8	53.4		
CAU020]	77.2	77.0	-	73.2	99.6	73.4	73.6	99.5	73.4	98.1	76.9	77.4	73.0	73.4	72.7	75.8	76.1	88.5	77.4	75.2	75.1	66.7	64.7	71.6	76.1	74.1	75.4	74.0	73.5	53.1	54.5	57.2	56.4		
CAU022]	74.0	73.8	73.1	-	73.2	97.1	97.3	73.2	98.7	73.2	74.4	74.0	94.8	92.7	94.5	74.7	73.6	73.6	73.6	72.8	72.7	63.9	63.2	73.2	74.9	73.3	75.4	73.4	73.3	52.1	56.8	56.3	53.9		
CAU029]	77.2	77.0	99.6	73.1	-	73.4	73.6	99.3	73.4	97.9	76.9	77.4	72.9	73.4	72.6	75.7	76.1	88.6	77.4	75.2	75.1	67.0	64.6	71.5	76.0	74.0	75.3	74.0	73.5	53.6	55.3	57.6	57.2		
CAU033]	74.3	74.1	73.3	97.1	73.3	-	99.8	73.4	97.6	73.2	74.8	74.3	95.5	93.4	95.2	75.0	73.9	73.6	73.9	73.3	73.2	64.1	64.1	73.8	75.3	73.4	75.8	73.8	74.0	52.3	54.6	55.0	53.7		
CAU034]	74.5	74.3	73.5	97.3	73.5	99.8	-	73.6	97.8	73.4	75.0	74.5	95.7	93.6	95.4	75.1	74.1	73.8	74.0	73.4	73.4	64.3	64.2	74.0	75.4	73.5	76.0	74.0	74.1	51.8	57.0	55.1	53.9		
CAU035]	77.1	76.9	99.5	73.1	99.3	73.3	73.5	-	73.4	97.8	76.8	77.3	73.0	73.4	72.7	75.6	75.8	88.4	77.4	75.0	74.5	67.2	64.5	71.4	75.9	74.2	75.1	73.7	73.6	53.6	54.1	56.5	56.6		
253]	74.1	74.0	73.3	98.7	73.3	97.6	97.8	73.3	-	73.5	74.9	74.4	96.0	93.4	95.7	75.2	74.2	73.7	74.2	72.8	72.7	64.4	63.6	73.4	75.2	73.6	75.9	74.0	74.1	51.2	57.1	55.8	53.8		
pv5249]	77.0	76.9	98.1	73.1	97.9	73.1	73.3	97.8	73.4	-	77.4	77.5	72.8	73.5	72.5	76.2	76.2	88.8	77.5	75.1	75.2	66.6	64.9	71.8	76.3	73.9	75.9	74.1	73.5	53.6	54.6	57.2	56.7		
WA]	92.4	92.2	76.9	74.4	76.9	74.8	75.0	76.8	74.9	77.4	-	92.3	74.7	75.2	74.5	76.3	75.4	76.9	76.9	75.0	74.0	67.0	65.6	71.9	76.2	75.9	74.5	75.2	74.2	54.7	51.8	57.7	54.1		
417]	97.1	99.2	77.4	74.0	77.4	74.3	74.5	77.3	74.4	77.5	92.3	-	73.7	75.0	73.4	76.6	76.5	78.2	76.1	74.9	74.7	65.9	65.8	72.7	76.7	74.9	75.9	75.8	74.4	55.4	56.4	59.2	52.4		
TMC-II]	74.0	73.5	72.8	94.8	72.7	95.5	95.7	72.8	96.0	72.6	74.7	73.7	-	95.2	98.6	75.2	73.4	73.2	72.8	72.2	64.6	63.1	73.0	74.4	73.8	75.4	73.5	73.3	53.7	57.3	54.7	54.9			
95B]	75.1	74.9	73.4	92.7	73.4	93.4	93.6	73.4	93.4	73.5	75.2	75.0	95.2	-	94.5	75.8	74.8	73.8	74.2	72.9	73.1	64.6	64.8	74.6	75.4	73.5	76.7	74.7	74.7	54.9	54.5	57.2	54.7		
KUN]	73.6	73.2	72.5	94.5	72.4	95.2	95.4	72.5	95.7	72.3	74.5	73.4	98.6	94.5	-	74.7	73.2	72.8	73.3	72.2	71.7	64.2	62.5	72.6	62.8	75.1	78.3	77.0	78.3	77.4	78.2	53.0	53.5	51.4	52.6
SALI]	76.2	76.4	75.6	74.7	75.5	75.0	75.1	75.4	75.2	76.0	76.3	76.6	75.2	75.8	74.7	-	81.8	77.0	77.0	77.5	77.0	64.9	68.6	66.7	74.8	78.2	77.0	78.7	75.8	76.9	53.0	55.1	53.4	53.8	
YO]	76.2	76.0	75.9	73.6	75.9	73.9	74.1	75.6	74.2	76.2	75.4	76.5	73.4	74.8	73.2	81.8	-	76.2	78.4	77.0	77.0	65.6	66.7	74.8	78.2	77.0	78.7	75.8	76.9	53.0	55.1	53.4	53.8		
Gottfried]	78.0	77.9	88.5	73.5	88.6	73.5	73.7	88.4	73.6	88.8	76.9	78.2	73.0	73.7	72.6	76.9	76.0	-	76.2	76.1	75.2	66.0	65.0	73.0	75.3	74.7	75.1	72.7	75.0	53.4	57.1	57.5	55.0		
OSU]	75.7	75.4	77.2	73.6	77.2	73.9	74.0	77.2	74.2	77.3	76.9	76.1	73.3	74.2	73.3	77.0	78.4	76.0	-	75.9	75.3	66.7	66.0	74.7	78.2	75.5	83.1	75.5	75.2	52.0	56.2	54.9	53.6		
UK]	75.5	74.7	75.1	72.8	75.1	73.3	73.4	74.9	72.8	75.0	74.6	74.9	72.6	72.9	72.1	77.5	77.0	75.9	75.5	-	95.9	64.1	65.2	74.2	75.6	74.4	75.0	74.5	74.4	50.2	52.3	52.5	52.0		
IND]	75.1	74.7	75.0	72.7	75.0	73.2	73.4	74.5	72.7	75.1	74.0	74.7	72.2	73.1	71.7	77.0	77.0	75.2	74.8	95.9	-	63.6	64.6	74.5	75.0	74.9	74.5	73.5	73.9	51.1	55.2	53.8	52.4		
CH2]	63.8	63.2	65.2	62.4	65.3	62.7	62.9	65.5	62.9	65.1	65.2	64.1	63.0	63.1	62.6	63.1	63.7	64.8	65.4	62.6	61.9	-	72.9	62.4	64.7	63.6	64.3	65.0	66.5	51.4	55.6	58.3	55.8		
PO-13]	64.9	64.4	63.6	62.0	63.5	62.8	62.9	63.4	62.4	63.7	64.2	64.4	62.0	63.4	61.4	66.3	65.0	63.8	64.9	64.0	63.5	72.3	-	63.9	66.5	65.2	66.5	65.7	64.3	51.8	54.4	55.3	53.4		
B37]	72.9	72.5	71.5	73.2	71.4	73.8	74.0	71.3	73.4	71.8	71.9	72.5	73.0	74.4	72.6	75.1	74.8	72.8	74.7	74.2	74.5	61.2	62.8	-	74.9	75.8	76.2	73.4	73.6	50.4	50.9	57.5	53.2		
116E]	76.0	76.3	76.0	74.9	75.9	75.2	75.3	75.8	75.1	76.3	76.2	76.6	74.3	75.3	73.8	78.2	78.2	75.2	78.2	75.5	75.0	63.3	65.5	74.9	-	75.6	78.8	76.9	75.5	50.9	55.6	57.4	54.0		
Mc35]	75.7	74.8	73.9	73.3	73.8	73.4	73.5	74.0	73.6	73.9	75.3	74.8	73.8	73.5	73.2	77.0	76.5	74.6	75.1	74.4	74.6	62.6	63.7	75.8	75.5	-	75.9	72.9	74.0	51.3	54.5	54.5	54.6		
YM]	75.7	75.5	75.4	75.4	75.3	75.8	76.0	75.1	75.9	75.9	74.5	75.8	75.4	76.6	75.3	78.3	78.7	75.1	83.1	75.0	74.5	62.8	64.4	76.0	78.8	75.5	-	75.1	74.6	50.3	54.8	54.8	55.0		
L26]	75.4	75.1	73.8	73.4	73.8	73.8	74.0	73.6	74.0	73.9	75.2	75.5	73.5	74.7	73.4	77.4	75.8	72.7	75.5	74.5	73.5	63.5	64.6	73.4	76.8	72.9	74.7	-	75.4	52.6	53.7	56.5	54.1		
L338]	72.4	72.3	71.8	71.6	71.8	72.4	72.5	71.9	72.5	71.8	72.5	72.7	71.6	73.0	71.1	76.4	75.2	73.1	73.5	72.7	72.3	64.3	62.6	71.9	73.8	72.4	72.9	73.7	-	53.3	50.6	56.4	55.8		
Adult]	38.8	38.6	40.0	38.4	40.4	38.7	38.4	40.4	38.1	40.4	38.7	40.0	39.0	40.2	39.6	38.9	39.6	38.9	39.3	37.4	37.9	37.7	38.2	37.3	38.2	38.9	37.3	38.5	40.3	-	65.8	53.8	52.8		
Nemuro]	40.2	39.8	39.9	41.4	40.2	40.4	41.5	39.7	41.6	39.9	38.2	40.6	41.7	40.3	41.4	38.9	40.0	41.5	41.4	38.1	39.9	41.1	39.9	37.7	39.7	39.7	39.7	39.0	38.1	63.8	-	52.5	52.8		
E93]	53.1	53.6	53.9	53.5	54.2	52.6	52.7	53.5	53.2	53.6	53.7	54.7	52.3	53.4	52.8	49.5	51.3	54.0	52.2	49.8	50.6	53.8	53.2	53.0	53.6	51.9	52.1	53.2	52.9	38.5	38.1	-	84.4		
Cowden]	51.6	51.0	53.4	50.9	54.0	50.7	50.9	53.6	50.9	53.7	51.7	50.6	52.1	51.4	51.4	50.2	51.6	52.3	51.0	49.7	50.4	51.8	51.7	51.0	51.2	51.6	52.1	51.4	52.8	38.5	39.1	84.4	-		

송미옥 등: 로타바이러스 VP7 유전자 형별 및 염기서열

	87a.a	101a.a	120a.a	30a.a	143a.a	152a.a	207a.a	220a.a
GH2	~	KAADT-----E IADPEWKAT	~	EYQDLVTFSNDP	~	HYTNDVALD	~	CQTTNTDTFELTM
PO-13	~	NEAET-----E IINDNEWKDT	~	GYADLGQSFNNP	~	KYDQNAGLD	~	CQTTDQVATFEQLTA
CAU-020	~	SEAPT-----Q ISDTEWKDT	~	EYSNVLEFSIEP	~	KFASGEELD	~	CQTTNTATFETVAD
CAU-035	~	SEAPT-----Q ISDTEWKDT	~	EYSNVLEFSIEP	~	KFASGEELD	~	CQTTNTATFETVAD
CAU-029	~	SEAPT-----Q ISDTEWKDT	~	EYSNVLEFSIEP	~	KFASGEELD	~	CQTTNTATFETVAD
PV5249	~	SEAPT-----Q ISDTEWKDT	~	EYSNVLEFSIDP	~	KFASGEELD	~	CQTTNTATFETVAD
GOTTFRIED	~	SEAPT-----Q ISDTEWKDT	~	EYSNVLEFSIDP	~	KFASGEELD	~	CQTTNTATFETVAD
CAU-009	~	TEASA-----Q ISDGEWKDS	~	EYSNVVDFSVDP	~	KYDQNLELD	~	CLTTNVDSFETVAE
417	~	TEAST-----Q ISDGEWKDS	~	EYSNIVDFSVDP	~	KYDQNLELD	~	CLTTNVDSFETVAE
CAU-003	~	TEARA-----Q ISDGEWKDS	~	EYSNIVDFSVDP	~	KYDQNLELD	~	CQTTNVDSFETVAE
WA	~	TEAST-----Q IINDGDKKDS	~	EYSNIVDFSVDP	~	KYDQSLELD	~	CQTTNVDSFEMIAE
UK	~	VEASN-----E MADTEWKDT	~	EYTDIAAFSVEP	~	KYDSTQKLD	~	CLITNPDTFETVAT
IND	~	VEASN-----E IADTEWKDT	~	EYTDIAAFSVEP	~	KYDSTQKLD	~	CLITNPDTFETVAT
MC35	~	TEART-----E IINDNEWTST	~	EYDDIATFSVDP	~	RYNSSLELD	~	CQTTNTRTFEEVAT
SA11	~	TEAAT-----E IINDNSWKDT	~	EYTNIASFSVDP	~	KYDATLQLD	~	CLTTDATTFFEEVAT
YO	~	TEAAT-----E IINDNSWEDT	~	AYTNIASFSVDP	~	KYDATLQLD	~	CLTTDATTFFEEVAT
OSU	~	NEAAT-----E IADTKWTET	~	GYADIASFVEP	~	KYDGNLQLD	~	CSTTDINSFETVAN
YM	~	HEAAT-----Q IADDKWKDT	~	EYTDIASFSVDP	~	KYDGNLQLD	~	CLTTDPTTFEEVAS
B37	~	VEAET-----E IADGSKWKDT	~	SYTDIATFSINP	~	KYNSLELD	~	CLTTDPTTFEEVAT
116E	~	IEAST-----Q IGDTEWKGDT	~	EYTDIASFSIDP	~	KYNSLELD	~	CITTTNATFEEVAT
CAU-022	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKNTNVDTFEIVAS
253	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
CAU-033	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
CAU-034	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
TMC-11	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
KUN	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
95B	~	TEAKN-----E ISDNEWENT	~	DYNDITTFSMNPN	~	RYDNTSELD	~	CKTTOVDTFEIVAS
L26	~	NSVTT-----E ITDPOWTHT	~	SYADIASFVNPN	~	QYQNSLALD	~	CITTTDQVATFEEVAN
L338	~	NEVVS-----E LINDOSWKNT	~	EYSDIASFSINP	~	KYSTELQLD	~	CLTTDTETFEEVAT
E93	~	NAVVGSGQPGKSDGHLNDGNYAQT	~	TYTQTSDFINSV	~	POSPNDSSES	~	CSPASTETYEWSVN
PORCINE	~	NAVVGSGQPGKSDGHLNDGNYAQT	~	TYTKVSDVDVSV	~	POSPNDSSES	~	CSPASTETYEVLSN
ADULT	~	DDHQA-----D-ANKFNGN	~	SSSSYVDIIVS	~	I0VFNASMD	~	COTQLSOTYFEST
BOVINE	~	SDWN-----VNSFGDN	~	DSTNVYDIIIS	~	I0VIKPEMD	~	COTQINGTYFLSE

Figure 4. Amino acid sequence multialignment of CAU isolates with rotaviruses sequence from GenBank. A dot (.) represents an identical residue to CAU-022 and a dash (~) is a gap. Dim shaded boxes are type-specific primer binding sites and dark shaded boxes are changed bases within same serotype.

209번째 아미노산 T (Thr)이 N (Asn)으로 211번째 아미노산 D (Asp)가 N (Asn)으로 변이되어 있었다.

7. 아미노산 서열의 특성

CAU주들과 GenBank에 등록된 외국유래주의 아미노산을 다중정렬하여 상동성을 분석하여 Table 4를 작성하였다. A군의 상동성 범위는 51.7%에서 100%이며 같은 혈청형으로 분류되어 상관관계가 밀접했던 주들은 모두 79.6% 이상의 상동성이 있었다. G1에서 CAU-009은 일본유래주 417주와 92.9%, 국내주 CAU-003과 90.2%로 일본유래 417주와 더 높은 유연관계를 나타냈으며 G2에서 인도유래 253주과 더 밀접함을 보였던 CAU-022는 인도유래 253과 95.2%, CAU-033과 90.3%, CAU-034와 92.1%로 나타났다. 염기서열에서 근소한 차이를 나타냈던 G4의 CAU-020, CAU-029, CAU-035는 모두 100%의 상동성을 보임으로서 국내주 간에 아미노산 서열이 동일하였다.

고찰

세계적으로 A군 로타바이러스는 어린이 설사의 주된 바이러스성 원인으로 여러 종류의 type, subtype 및 multiple type을 가지고 있으며 교차면역이 불가능하고 동시에 한 집단에 전파될 수 있기 때문에 type을 결정하는 것은 감염의 예방과 백신 개발을 위해 매우 중요하다. 로타바이러스의 형별 기준이 되는 VP7과 VP4는 오래 전부터 혈청중화 시험에 의하여 그 type이 결정되어 왔으나 (11) 오랜 시간이 소요되고 특히 조직 배양으로 증식되는 바이러스에만 적용될 수 있는 단점이 있었다. 이러한 이유로 쉽게 구할 수 있는 분변에서 로타바이러스의 G 혈청형을 직접 확인할 수 있는 새로운 방법이 최근 개발되었다 (14,16). 즉 VP7 단백에 특이적으로 반응하는 MoAb를 이용한 효소면역측정법과 각 혈청형에 특이적으로 존재하는 VP7 유전자를 probe로 이용한 nucleic acid hybridization법이다. 이들은 분변재료로부터 G 혈청형

Table 4. A comparison of identities on VP7 gene amino acid sequences of Korean isolates with foreign strains from GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
CAU003]	-	95.8	82.9	90.0	77.4	93.9	91.2	82.9	91.4	94.6	91.8	91.7	90.9	90.3	93.8	86.7	97.4	88.9	86.2	90.7	87.2	85.7	80.0	85.7	80.0	85.7	96.9	90.7	89.7	83.9	92.9	57.1	28.6	59.1	57.9		
CAU009]	90.2	-	81.6	81.6	81.6	94.7	95.0	81.6	94.7	83.9	83.3	96.3	93.8	90.6	97.3	68.8	75.0	79.4	89.7	90.6	82.4	75.0	75.9	97.1	75.0	69.6	78.4	95.2	75.8	33.3	57.1	50.0	75.0	75.0	75.0		
CAU020]	76.3	70.5	-	92.9	100.0	96.8	96.9	100.0	97.0	100.0	90.0	82.9	87.5	93.8	97.1	88.1	92.3	100.0	90.3	90.9	92.7	96.0	52.2	87.2	85.7	84.6	71.4	90.6	81.1	62.5	42.9	61.1	50.0	66.7	35.7	73.9	
CAU022]	77.1	73.8	72.2	-	92.6	98.2	98.3	92.9	100.0	92.6	85.7	77.8	98.2	94.3	98.1	60.7	70.0	92.9	77.4	84.8	96.8	84.0	56.2	81.8	76.7	66.7	84.4	75.0	86.1	50.0	66.7	35.7	73.9	73.9	73.9	73.9	
CAU029	70.6	70.5	100.0	71.4	-	96.7	96.8	100.0	96.9	100.0	90.0	82.9	87.1	93.5	97.0	76.3	83.9	100.0	90.0	90.2	92.5	95.8	52.2	86.8	80.0	84.2	73.5	90.0	80.6	62.5	42.9	61.1	50.0	62.5	42.9	61.1	50.0
CAU033]	83.8	83.7	78.9	90.3	78.4	-	100.0	96.8	100.0	94.1	93.1	94.1	94.4	96.7	98.2	92.9	87.5	96.8	88.1	83.3	87.1	87.5	57.9	87.5	89.7	90.6	88.9	95.2	83.9	62.5	60.0	47.4	57.9	57.9	57.9	57.9	
CAU034]	83.8	86.4	81.6	92.1	81.1	98.5	-	96.9	100.0	96.8	92.9	94.3	98.3	96.7	98.3	86.7	88.9	96.9	82.5	83.9	91.2	76.9	78.3	90.0	82.4	88.2	92.1	88.1	93.8	54.5	60.0	55.0	65.2	65.2	65.2	65.2	
CAU035]	76.3	70.5	100.0	72.2	100.0	78.9	81.6	-	97.0	100.0	90.0	82.9	87.5	93.8	97.1	88.1	92.3	100.0	90.3	90.9	92.7	96.0	52.2	87.2	85.7	84.6	71.4	90.6	81.1	62.5	42.9	61.1	50.0	62.5	42.9	61.1	50.0
253]	86.5	83.7	84.2	95.2	83.8	96.9	98.5	84.2	-	96.9	93.1	91.4	98.3	96.6	98.3	87.5	85.7	96.7	95.2	81.2	93.5	89.7	77.3	91.4	85.3	75.9	91.7	88.6	87.9	54.5	60.0	52.6	65.2	65.2	65.2	65.2	
pv5249]	76.1	66.7	96.7	71.4	96.7	82.1	81.1	96.7	83.8	-	90.3	91.9	87.1	91.4	97.0	65.5	86.8	100.0	92.9	90.7	90.5	92.3	83.9	86.1	83.3	86.1	73.5	90.6	90.5	70.0	42.9	47.1	47.6	47.6	47.6		
WAJ]	88.2	77.8	81.8	72.7	81.8	81.8	83.9	81.8	87.1	82.4	-	88.6	100.0	89.3	100.0	87.9	91.4	92.0	84.8	81.2	85.3	84.6	86.2	93.8	69.6	95.1	81.2	93.5	78.8	83.3	40.0	50.5	50.0	50.0			
417]	86.3	92.9	70.7	73.7	70.7	78.0	80.5	70.7	80.0	72.3	79.6	-	89.3	84.8	96.9	85.3	93.5	82.1	83.8	86.1	90.5	83.9	74.2	88.6	75.0	80.6	77.4	97.2	86.4	50.0	60.0	63.6	72.7	72.7	72.7		
TMC-III]	81.1	81.1	75.7	90.3	75.0	91.1	93.4	75.7	95.2	75.0	79.3	75.8	-	94.4	95.0	80.0	74.1	86.2	83.3	81.2	93.3	88.9	61.5	82.9	65.5	61.5	85.2	92.7	80.0	57.1	72.7	52.4	62.5	62.5	62.5		
95B]	80.0	82.9	76.9	86.2	76.3	96.7	95.1	76.9	93.3	80.0	78.1	73.7	91.1	-	96.5	90.0	88.0	93.8	85.7	82.9	89.7	91.7	60.9	89.3	92.6	61.5	89.7	95.6	88.2	62.5	66.7	52.2	52.6	52.6	52.6		
KUN]	85.7	83.7	82.5	87.9	82.1	93.3	95.1	82.5	93.7	82.1	82.8	77.5	93.4	91.7	-	87.5	89.3	96.9	82.4	84.4	93.3	86.2	52.4	88.2	83.9	84.8	89.7	87.8	88.6	50.0	81.8	52.4	61.5	61.5	61.5		
SAH]	78.0	57.9	80.4	53.1	72.5	70.3	68.4	80.4	71.8	54.3	76.3	69.0	58.8	69.2	70.0	-	98.0	85.4	94.2	92.3	89.7	93.5	87.2	88.5	93.5	89.6	96.6	94.6	81.0	66.7	50.0	44.4	65.4	65.4	65.4		
YO]	79.2	64.3	80.0	61.8	70.3	56.8	61.5	80.0	61.5	71.7	72.7	70.7	55.6	57.9	62.5	87.7	-	85.0	93.8	87.0	90.2	93.3	75.0	95.8	89.1	95.7	95.6	85.2	88.6	57.1	55.6	50.0	50.0	50.0			
78.0	67.5	96.7	72.2	96.6	78.9	81.6	96.7	78.4	93.1	76.7	60.5	69.4	76.9	81.6	77.8	73.9	-	85.3	87.2	95.6	65.2	57.7	97.1	85.7	85.7	82.5	81.6	95.2	62.5	50.0	75.0	55.0	55.0				
OSU]	69.4	77.8	80.0	61.5	79.4	78.7	75.0	80.0	75.5	84.8	73.7	68.9	66.7	76.6	73.7	81.7	80.4	80.6	-	85.7	85.1	90.9	80.0	90.5	90.0	90.9	90.2	84.4	75.0	71.4	44.4	65.5	52.0	52.0			
UK]	81.2	76.3	80.0	68.3	78.7	71.4	74.3	80.0	70.3	83.0	74.3	70.5	66.7	76.3	71.1	82.8	74.1	79.1	82.4	-	100.0	88.6	77.8	79.5	93.8	79.2	89.1	74.1	98.0	60.0	40.0	65.4	62.1	62.1	62.1		
IND]	73.9	70.0	80.9	76.9	80.4	79.4	81.6	80.9	80.6	82.6	78.4	76.0	75.7	76.5	77.8	74.5	72.5	84.3	81.6	93.8	-	93.8	75.8	85.4	87.5	78.9	91.7	84.4	93.0	88.9	53.8	63.0	71.4	71.4	71.4		
CH2]	68.6	61.8	77.4	60.0	76.7	72.4	62.5	77.4	68.4	80.0	66.7	66.7	63.2	75.9	64.1	70.7	66.7	51.7	81.1	79.5	88.2	-	91.9	71.4	83.3	86.7	82.1	87.5	84.6	77.8	75.0	76.9	78.1	78.1	78.1		
PO-13]	54.5	55.0	42.9	42.9	42.9	47.8	56.2	42.9	56.7	59.1	55.6	54.8	53.3	51.9	45.8	60.7	45.3	48.4	60.4	57.1	59.5	73.9	-	81.2	52.0	93.5	56.5	90.9	75.0	88.9	91.7	48.1	56.0	56.0	56.0		
B37]	77.4	82.5	79.1	77.1	78.6	71.8	75.0	79.1	80.0	73.8	81.1	79.5	72.5	71.4	75.0	85.2	85.2	82.9	79.2	66.0	71.4	55.6	55.3	-	91.1	82.2	88.4	85.2	90.6	66.7	88.9	52.6	57.7	57.7			
116E]	79.5	61.8	69.8	67.6	66.7	72.2	70.0	69.8	74.4	71.4	57.1	60.0	59.4	73.5	70.3	79.6	75.9	69.8	83.3	80.4	72.9	65.8	46.4	83.7	-	92.2	86.7	80.0	97.4	66.7	77.8	61.5	60.0	60.0			
Mc35]	83.0	57.1	82.5	55.2	82.1	72.5	73.2	82.5	62.9	75.6	83.0	69.4	57.1	57.1	70.0	87.8	83.3	78.9	81.6	74.5	66.7	70.3	59.2	77.1	87.0	-	91.1	83.9	90.7	55.6	60.0	50.0	47.4	47.4			
YM]	83.3	70.7	64.1	71.1	65.8	82.1	83.3	64.1	80.5	65.8	78.8	64.9	76.7	83.3	78.8	87.7	78.2	71.7	83.6	86.0	84.6	76.7	46.4	80.9	76.5	78.8	-	80.6	97.4	71.4	60.0	66.7	72.2	72.2	72.2		
L26]	74.3	85.1	70.7	72.4	69.2	87.0	82.2	70.7	84.8	74.4	82.9	81.4	88.4	87.8	81.8	76.1	71.9	68.9	69.2	58.8	65.9	65.1	69.8	67.6	66.7	66.7	70.7	-	86.7	42.9	60.0	58.8	50.0	50.0			
L338]	83.0	71.4	69.8	81.6	69.0	68.4	75.0	69.8	76.3	76.0	68.4	82.6	72.7	73.2	72.1	73.9	68.9	74.1	60.0	84.7	78.4	64.7	53.3	80.6	88.4	78.0	84.1	78.8	-	55.6	50.0	69.6	57.9	57.9			
Adult]	7.7	5.7	8.9	11.1	8.9	9.1	10.5	8.9	10.7	11.7	9.4	8.0	13.6	9.1	7.4	13.8	13.3	8.6	8.8	10.0	13.6	11.9	14.3	14.3	13.8	8.9	15.6	6.0	9.4	-	87.5	66.7	60.0	60.0			
Nemuro]	3.3	6.7	4.7	12.3	4.7	9.1	9.2	4.7	9.4	4.5	3.3	5.4	12.3	9.2	13.2	4.9	7.8	6.0	5.9	5.8	9.7	12.7	16.2	12.9	19.2	9.1	4.8	5.1	6.8	56.0	-	66.7	50.0	50.0			
E93]	48.1	46.2	42.3	22.7	42.3	45.0	50.0	42.3	45.5	29.6	38.1	46.7	50.0	50.0	47.8	33.3	41.7	46.2	57.6	53.1	54.8	62.5	40.6	37.0	50.0	32.0	51.9	41.7	55.2	13.8	9.4	-	92.3	92.3			
Cowden]	34.4	47.4	32.1	43.6	32.1	36.7	42.9	32.1	41.7	37.0	24.1	42.1	42.9	33.3	44.4	38.6	29.2	39.3	35.1	41.9	45.5	56.8	41.2	35.7	33.3	30.0	40.6	29.0	33.3	9.1	4.2	70.6	-	70.6			

을 직접 그리고 신속·민감하게 확인할 수 있으나 특이성에 문제점이 있었다. 또한 Rodger 등 (15)은 로타바이러스가 자연계에서 계속하여 변이한다고 보고하였는데 이들 방법으로는 다른주와의 감별이 불가능하며 형결정에 어려움이 있다. 그 예로서 1987-1988년에 수집된 한국분리주 12개를 대상으로 미국에서 serotyping, RT-PCR, probe hybridization을 실시한 결과 총 12 분리주 중 4주는 G1, 1주는 G3로 결정되었으나 나머지 7주는 그 형을 확인할 수 없었다 (8).

본 연구에서는 로타바이러스 감염의 증세를 보인 한국영아의 분변에서 직접 중화항체 형성에 관여하는 VP7의 유전자를 증폭하였고 multiplex PCR을 통하여 우선적으로 혈청형을 결정하였으며 염기서열로 여러 혈청형과 비교 분석하여 혈청형을 재확인함과 동시에 외국 유래 로타바이러스와 염기서열 상동관계도 조사하였다. 또한 neutralizing epitope region과 type-specific region의 염기서열변화를 조사함으로써 PCR을 통해 확인할 수 없었던 변이의 분석을 시도하였다. Multiplex PCR에서 본 실험에 사용된 국내분리주들은 A군 로타바이러스의 G1-2주, G2-3주, G4-3주로 증폭되어 Kim (13)과 Cha (1)의 보고처럼 G1이 국내에서 우세한 주라는 결과와 차이가 있었다. 이것은 로타바이러스가 혈청형에 따른 유행감염의 특성을 갖고 있기 때문이라고 추정할 수 있으며 이런 문제점을 극복하기 위해서는 전국적이면서도 장기적인 시료수집이 필요하다고 생각된다.

로타바이러스는 286 a.a와 326 a.a 길이의 두 open reading frame (ORF)를 가지고 있다. 326 a.a의 ORF는 염기서열에서 49~1,029 bp에 해당하며 286 a.a의 ORF는 136~1,029 bp로 국내분리주 모두는 이와 동일하였다. 326 a.a의 ORF에서 87~101 a.a, 143~152 a.a, 207~220 a.a는 neutralizing epitope을 구성하는 부위로 염기서열이나 아미노산 서열이 각 혈청형에 따라 구분될 정도로 잘 보존되어 있었다. 이 부분의 염기서열만을 국내분리주간에 비교해 볼 때 G1의 CAU-003, G2의 CAU-022가 2염기정도 바뀌었을 뿐이었다. 부분 염기서열 분석이 전체 염기서열에서와 같은 결과를 보이므로 염기서열 분석에 있어 전체 염기에서의 분석이 아닌 부분 염기서열 분석만으로 분류가 가능하다는 것을 암시하고 있다. Multiplex PCR에 사용된 type-specific primer의 염기서열을 국내분리주와 비교해 본 결과 2개 내지 3개 염기의 차이를 보였

으며 모두 같은 염기로 치환되어 있었다. 이를 아미노산 서열에서 보면 G1 primer에 해당하는 90 a.a 이 CAU-003에서 S (Ser)가 R (Arg)로 94 a.a가 WA를 제외한 모든 G1에서 N (Asn)이 S (Ser)로의 차이를 나타냈고 나머지 G2 primer나 G4 primer에서는 변화가 없었다. 이런 염기서열의 변화나 아미노산의 변화는 probe를 사용한 hybridization이나 단클론항체법에 의한 혈청형결정에서는 민감도가 떨어질 가능성이 있다. VP7 유전자의 전체 염기서열을 외국에서 보고된 G1-G13의 염기서열과 상동성을 비교한 결과 37.3%에서부터 99.8%까지의 상동범위를 가지고 있었으며 phylogenetic tree에서 같은 혈청형으로 분류되어 유전적으로 높은 상관관계를 보였던 주들은 88% 이상의 상동성이 있었다. G1의 CAU-009은 국내분리 CAU-003와 97.6%, 일본의래주 417과 99.2%, 미국유래주 WA와 92.2%의 상동성으로 CAU-009은 417, CAU-003, WA순으로 밀접한 상관관계를 보였다. 또한 G1의 CAU-022도 CAU-033 (97.1%), CAU-034 (97.3%)보다는 인도분리주 253 (98.7%)과 더 밀접함을 나타냈는데 이는 CAU-009나 CAU-022가 외국에서 유래된 주일 가능성을 배제할 수 없으며 또는 자연계에서 계속적으로 변이하는 로타바이러스의 특성상 유사한 환경으로 인한 염기서열의 변화라고도 생각할 수도 있다.

로타바이러스는 사람뿐 아니라 포유동물 및 조류에까지 넓은 숙주범위를 갖고 있다. 또한 최근에 동물에서만 분리된다고 믿어졌던 G5, G6 및 G10형이 사람 신생아에서 질병을 유발했으며 P형도 개와 고양이의 로타바이러스인 P13이 이스라엘, 미국, 브라질의 유아들에서 검출된 바 있다. 소 로타바이러스의 유전자형인 P11 (B223)이 인도의 신생아에서 분리 보고되었고, 돼지에서는 G1과 G5의 혼합분리주가 발견되었다 (17). 이런 보고는 로타바이러스가 사람 동물 구별없이 다양한 혈청형에 의해 발병할 잠재성이 있음을 보여준다. 그러므로 백신개발에 있어 대상이 되는 숙주에 따른 로타바이러스의 항원적 특이성을 유전적 분석으로 조사해 볼 필요가 있다고 생각한다. 이번 실험의 결과로 미루어 짐작할 때 숙주범위가 혈청에 따라서는 뚜렷이 구분이 되며 같은 혈청형 내에서도 다른 숙주를 가진 것보다 같은 숙주를 갖는 것이 더 밀접하다는 것을 수상대에서 쉽게 볼 수 있었다. 예로서 G4의 사람유래 분리주 CAU-020, CAU-029, CAU-035, pv5249는 서로 97.8%

이상의 상동성을 갖고 있으나 돼지유래주인 Gottfried는 최고 88.6%의 상동성만을 보였다. 1996년 Dennehy 등 (3)은 사람 로타바이러스와 매우 유사한 VP7의 항원 수용기를 갖은 rhesus rotavirus (RRV)의 G1에서 G4까지 혈청형으로 동물 사람 4가 백신 (tetraivalent vaccine)을 제조하였다. 이를 24주 이내의 영아에게 투여하여 면역효과를 시험하였으나 백신으로서의 효과가 거의 없었다. 따라서 Kim 등 (12)이 제시한 것처럼 국내 로타바이러스 감염증에 대한 효과적인 백신개발을 위해서는 같은 혈청형의 국내분리주를 사용하거나 계통학적으로 가장 근접한 외국유래주에 근거하여 연구되어야 할 것으로 생각된다. 이 실험은 현재 새로운 백신개발을 위해 진행 중인 바이러스양입자 (VLP: Virus-Like Particle)제조의 기초자료가 될 것이며, 유전자 검사를 위해 필요한 염기서열의 자료가 부족한 우리 나라에서 좋은 자료로서의 역할을 담당하게 될 것이라고 생각한다. 이상의 결과를 종합하면, 국내분리주들의 염기서열은 외국 분리주와 다소 차이가 있었으나 2주는 국내분리주보다 외국유래주와 더 밀접함을 나타내어 외국에서 유래되었을 가능성을 제시하였으며 결과의 정확한 분석을 위해 다양한 시료에 대한 계속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과기부 선도기술 개발사업 (신기능생물소재) 연구비 (98-G-08-03-A-18)의 일부와 1999년도 중앙대학교 교내학술연구비에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1) Cha KJ, Song JO, Cho HC, Kim YH, Yu DY, Lee JB, Lee CK, Koki T, Yu JH: Serotype and Nucleotide Analysis of Human Rotavirus Isolates in Korea. *J K Soc Virol* **29**: 75-86, 1999.
- 2) Cook SM, Glass RI, Lebaron CW, Ho MS: Global seasonality of rotavirus infections. *Bull WHO* **68**: 171-177, 1990.
- 3) Dennehy PK, Rodger Jr GC, Ward RL, Markwick AJ, Mack M, Zito ET: Comparative evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two dosages of oral tetraivalent rhesus rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **15**: 1012-1018, 1996.

- 4) Desselberger U, McCrae MA: The rotavirus genome. *Curr Microbiol Immuno* **185**: 31-66, 1994.
- 5) Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**: 410-419, 1989.
- 6) Gentsch JR, Das K, Jiang B, Bhan MK, Glass RL: Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B223 strain. *Virol* **194**: 424-430, 1993.
- 7) Gentsch JR, Glass RL, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 1365-1373, 1992.
- 8) Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK, Glass RI: Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. *J Infect Dis* **174**: S30-S36, 1996.
- 9) Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Woods PA, Clarke MJ, Ho MS, Gentsch JR: The Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in the United States: Surveillance and Estimates of Disease Burden. *J Infect Dis* **174**: S5-S11, 1996.
- 10) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* **28**: 276-282, 1990.
- 11) Hosino Y, Wyatt R, Greenburg HB, Flores J, Kapican AZ: Serotype similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J Infect Dis* **149**: 694-702, 1984.
- 12) Kim KH, Yang JM, Joo SI, Cho UG, Glass RI, Cho YJ: Importance of Rotavirus in acute gastroenteritis in Korean children. *J Clin Microbiol* **28**: 2279-2284, 1990.
- 13) Kim YB, Kim KH, Yang JM: cDNA cloning and nucleotide sequence determination for VP7 coding RNA segment of human rotavirus isolated in Korea. *K J Microbiol* **30**: 397-402, 1992.

- 14) **Lucchelli A, Kang SY, Jayasekera MK:** A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *J Vet Diagn Invest* **6:** 175-182, 1994.
 - 15) **Rodger SM, Bishop RF, Birch C, McLean B, Holmes IH:** Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia from 1973 to 1979 as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J Clin Microbiol* **13:** 272-278, 1981.
 - 16) **Rogen BI, Parwani AV, Lopez S:** Serotype differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 gene. *J Clin Microbiol* **32:** 311-317, 1994.
 - 17) **Santos N, Lima RC, Nozawa CM, Linhares RE, Gouvea V:** Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol* **37:** 2734-2736, 1999.
-