

국내분리 소 로타바이러스 NSP4 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

충북대학교 수의과대학¹, 중앙대학교 의과대학²

백명순¹ · 김원용² · 강신영^{1*}

=Abstract=

Cloning and Sequencing of Nonstructural Protein (NSP4) Gene of Bovine Rotavirus Isolated in Korea

Myoung-Soon Back¹, Won-Yong Kim² and Shien-Young Kang^{1*}

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University¹, Chongju, 361-763

College of Medicine, Chungang University², Seoul, 156-756, Korea

The nonstructural protein NSP4, encoded by gene 10 of rotavirus, has been shown to play a role in viral assembly and known to be an enterotoxin, causing diarrhea in mouse pups. NSP4 gene was cloned from CBNU-2 (virulent bovine rotavirus/diarrheic fecal sample) and CBNU-1 (cell-culture adapted bovine rotavirus/isolated from CBNU-2 and 75 times passaged on MA104 cells), respectively, by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced and compared. The sequence data indicated that the NSP4 genes of bovine rotavirus (BRV) were 751 bases in length and encoded one open reading frame of 175 amino acids beginning at base 42 and terminating at base 569. Differences in nucleotide sequence between CBNU-2 and CBNU-1 were observed at 6 positions (base 274, 296, 391, 394, 396 and 579). NSP4 gene of BRV exhibited a high degree of nucleotide (90% and 94%) and amino acid sequence (91% and 97%) homology with those of SA11 and UK but a low degree of nucleotide (77% and 79%) and amino acids sequence (81% and 85%) homology with those of Wa and OSU.

Key Words: Bovine rotavirus, NSP4, Cloning, Sequencing

서 론

Family *Reoviridae*에 속하는 로타바이러스는 사람은 물론 어린 동물에서 설사를 일으키는 원인체이다 [6,7,11,12,14,15]. 로타바이러스는 피막이 없으며 직경 75 nm의 icosahedral 형태로 triple layered protein capsid, 즉 outer capsid, inner capsid,

core protein으로 되어 있으며 genome은 11개의 분절로 구성된 dsRNA로 되어 있다 [3,11,12,21,22]. 각각의 분절은 6개의 구조단백질 (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 5개의 비구조단백질 (NSP1~5) 중 하나를 coding한다 [17].

로타바이러스는 항원분석에 따라 serogroup, subgroup 그리고 serotype으로 구분된다. Serogroup은 immunofluorescence, enzyme linked immunosor-

접수 : 2000년 1월 28일, 논문게재확정 : 2000년 3월 10일

연락처 address: 강신영, 충북 청주시 흥덕구 개신동 산 48번지 충북대학교 수의과대학

Tel: 0431-261-2598, Fax: 0431-267-3150, e-mail: sykang@cbucc.chungbuk.ac.kr

본 연구는 1998년도 한국과학재단 핵심전문연구비 (과제번호: 981-0613-066-2)에 의하여 수행되었음.

bent assay (ELISA), 그리고 immunoelectron microscopy 등의 방법에 의해 group-specific protein인 VP6에 기초하여 7개의 serogroups (A~G)으로 분류되어 있으며 각 serogroup은 genomic RNA electropherotype이 유사하다 [5,12,20,26]. 현재 분리된 소 로타바이러스에 대한 보고는 serogroups A, B, 그리고 C로 제한되어 있다 [13]. 그러나 이중에서도 serogroup A가 사람과 동물에서 위장염을 일으키는 주요한 원인체로 알려져 많은 연구가 되어져 왔다 [16,27,28].

로타바이러스의 outer capsid protein은 VP4 (viral protein 4)와 VP7 (viral protein 7)으로 구성되어 있으며 이 두 protein은 바이러스의 병원성, 면역원성 및 바이러스의 cell attachment와 penetration에 관여한다 [8,18,19,24]. 그리고 VP4와 VP7의 단백질 항원 특이성에 따라 각각 P type (protease sensitive protein type)과 G type (glycoprotein type)으로 분류되어진다. Inner capsid에서는 VP6 (viral protein 6)가 주요한 structural component로 core를 둘러싸고 있다. 이는 많은 바이러스 strain중에 공통적으로 잘 보존된 epitope이기에 진단에 주요한 antigen target으로 사용되고 있다 [18].

로타바이러스는 endoplasmic reticulum (ER)으로 budding할 때 subviral particle 상태에서 일시적으로 피막을 취하는 독특한 형성과정을 가지고 있다 [25]. 이 과정에서 로타바이러스의 10번째 분절에 의해 encode된 NSP4가 ER membrane에서 세포 내 수용체로 작용하여 많은 관여를 한다.

소 로타바이러스에 의한 설사는 보통 장 상피 세포의 파괴로 인한 이차적인 흡수불량과 상피세포간 세포액 균형의 변화 그리고 국소적인 용도의 ischemia 등에 의해 유도되는 것이 지금까지 알려진 일반적인 기전이었다. 그러나 최근 NSP4에 대한 연구가 이루어지면서 NSP4가 calcium의존 신호 전달경로에 의한 chloride 분비를 야기시키는 enterotoxin으로 작용하여 로타바이러스의 병원성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [2,29]. 특히 Ball 등 [2]의 연구에서 순수분리한 NSP4와 *in vitro*에서 합성된 22개의 아미노산으로 구성된 peptide (amino acid 114-135)는 6~10일령의 mouse에서 Ca^{2+} 의존신호 전달경로에 의해 chloride의 분비가 촉진되어 설사를 일으키는 것으로 보고되었다. 즉 NSP4가 설사를 유도하는 기전은 다른 세균의 enterotoxin과 같이 장내에 존재하는 특이 수용체와 NSP4가 결합하면 cAMP 또는 cGMP가 증

가되고 cyclic nucleotide 신호 전달경로가 활성화되어 Cl^- 의 분비를 증가시키는 반면 Na^+ 와 물의 흡수는 감소시켜 설사를 일으킨다고 한다.

최근 Zang 등 [29]은 돼지 로타바이러스 NSP4에서 병원성과 관련된 부위의 확인을 위해 병원성이 강한 돼지 로타바이러스와 이를 약독화시킨 바이러스의 염기서열을 비교 분석하여 염기서열 432-461 (아미노산 131-140) 부위가 병원성과 관련이 있음을 mouse를 이용한 *in vivo* 실험과 장 상피세포를 이용한 *in vitro* 실험을 통하여 확인하였다.

본 연구에서는 국내 소 로타바이러스 NSP4 유전자에서 병원성과 관련된 부위가 최근 돼지 로타바이러스의 NSP4 유전자 중 병원성과 관련되어 있다고 보고된 부위와의 관계를 확인하기 위하여 NSP4 유전자의 염기서열을 분석하였으며 다른 reference strain의 NSP4 유전자와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

본 실험에서 심한 설사증상을 보이는 송아지 설사분변에 함유되어 있는 로타바이러스 (CBNU-2)와 이 바이러스를 MA104 cell를 이용하여 순수 분리하고 75대 계대배양한 바이러스 (CBNU-1)를 사용하였다. 분변으로부터 바이러스 순수분리는 분변을 혈청이 없는 Eagle's minimum essential medium (EMEM)으로 10% (w/v)되게 희석하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 trypsin (Gibco BRL)을 10 µg/ml의 양이 되도록 넣어 37°C에서 1시간 배양하였다. 조직배양용 시험관에 monolayer가 형성된 MA104 cell을 혈청이 없는 배지로 3회 세척 후 여과한 분변 상층액 100 µl을 넣고 37°C에서 1시간 동안 회전배양한 후 혈청이 없는 배지로 1회 세척하여 trypsin (1 µg/ml)을 넣은 배지 1.5 ml 씩을 넣어 5일간 배양하였다. 이때 바이러스를 접종하지 않은 세포를 대조군으로 하여 배양기간동안 세포변성 (cytopathic effect: CPE)여부를 관찰하였다. 처음 5일간 관찰에서 세포변성이 일어나지 않은 경우, 배양액을 3회 얼리고 녹이는 과정을 반복한 후 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 위와 같은 방법으로 새로운 세포에 맹목계대배양 (blind passage)하여 CBNU-1을 분리하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Genes	Sequences (5'→ 3')	Positions
NSP4	+sense: GGCTTTTAAAAGTTCTGTTC	1- 20
	-sense: GGTCACTAAGACCATTCC	733-751

또한 위에서와 같은 방법으로 분리한 바이러스 (CBUN-1)를 25 cm² flask에 monolayer가 형성된 세포에 접종하여 5% CO₂가 함유된 37°C 배양기에서 3일간 배양하였으며 CPE가 형성된 세포의 배양 액만을 분리하여 새로운 세포에 접종하는 방법으로 75대 계대배양하여 바이러스를 약독화시켰다.

2. 바이러스 핵산추출과 정제

조직배양에서 증식한 바이러스 (CBNU-1)와 심한 설사증상을 보이는 송아지 설사분변으로부터의 로타바이러스 (CBNU-2)의 핵산추출은 Rosen 등 [23]의 방법을 이용하였다. 그리고 분변으로부터 얻은 바이러스의 핵산은 RNAaid[®]KIT with SPIN[™] (BIO 101)을 이용하여 제조사의 술식에 의하여 순수하게 정제하였다. 즉 DEPC 처리된 증류수로 재부유시킨 RNA에 RNA binding salt 3 volumes 넣어 잘 섞은 다음 RNA 1 µg당 RNAaid[®] Matrix[™] 1 µl 넣어 섞고 실온에서 5분 동안 방치시킨 후 원심하여 RNA/RNAaid[®] Matrix[™] 복합체를 침전시켰다. 상층액은 버리고 RNA wash solution 500 µl를 넣고 재부유시킨 후 원심분리하였다. 이러한 세척과정을 3회 반복 실시하였으며 pellet은 DEPC처리된 증류수 (10~20 µl/5 µl RNAaid[®] Matrix[™])에 재부유시켜 45~55°C에서 5분 동안 방치한 후 원심분리하여 상층액을 사용하였다.

3. 전기영동

추출된 dsRNA는 1% agarose gel상에서 100 volt로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색하여 UV illuminator로 분리된 핵산의 유무를 확인하였다.

4. RT-PCR

NSP4 유전자를 NSP4 특이 primer를 사용하여 RT-PCR법으로 증폭시켰다. NSP4 특이 primer의 nucleotide sequences는 GenBank의 data를 기초로 Table 1에서와 같이 NSP4 (751 bp) 전체를 증폭할 수 있도록 제작하였다. 추출한 RNA샘플 10 µl에

1 µl의 reverse primer를 넣고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5~10초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 µl, 5× first strand buffer 10 µl, 0.1 M DTT 5 µl, 10 mM dNTP 2 µl, RNase inhibitor 1 µl, reverse transcriptase (200 U/µl) 1 µl을 순서대로 넣어 반응용량 50 µl를 37°C에서 60분간 반응시켜 cDNA합성을 하였다. 합성된 cDNA template 10 µl에 DEPC 처리된 증류수 63 µl, 10× PCR buffer 10 µl, 25 mM MgCl₂ 12 µl, 10 mM dNTP 2 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, Taq DNA polymerase (5 U/µl) 1 µl를 넣어 전체반응용량 100 µl를 pre-PCR (95°C, 5 min), PCR (denaturation 94°C/45 sec, annealing 50°C/45 sec, extension 72°C/1 min, 25 cycles) 그리고 post-PCR (72°C, 7 min)을 핵산증폭기 (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 NSP4 유전자 크기는 1 kb DNA ladder (Gibco BRL)를 같이 전기영동함으로써 확인하였다.

5. cDNA크로닝과 염기서열 분석

NSP4 PCR 반응산물은 pGEM[®] T easy vector system II (Promega)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 크로닝하였다. NSP4 유전자가 삽입된 ligate를 선택하기 위하여 ampicillin (50 mg/ml, Amresco)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) agar에 isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG, 20 mg/ml, Amresco) 40 µl와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal, 20 mg/ml in dimethylformamide) 40 µl를 전체적으로 도말 후 형질 전환된 *Escherichia coli* cell을 도말하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 LB/ampicillin/IPTG/X-gal 배지에서 하얀 집락만을 골라내어 ampicillin이 첨가된 LB broth 3 ml에 접종하고 37°C에서 10시간 동안 현탁배양하였다. 배양된 *Escherichia coli*로부터의 플라스미드 추출은 Chowdhury에 의한 one step plasmid mini-preparation방법 [9]을



Figure 1. Electrophoretic migration patterns of bovine rotavirus dsRNA. M: 1 kb DNA ladder, CBNU-1: cell-culture adapted bovine rotavirus/isolated from CBNU-2 and 75 times passaged on MA104 cells, CBNU-2: virulent bovine rotavirus/diarrheic fecal sample.

사용하였다. 추출된 플라스미드는 *EcoRI* (10 U/ μ l, Gibco BRL)으로 37°C에서 1시간 반응하여 벡터와 insert를 쪼갬 후 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 insert의 삽입유무와 크기를 확인하였다. cDNA의 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termination을 원리로 하여 ALF express DNA sequencer (Pharmacia Biotech)에서 실시하였으며 염기서열 분석은 Clustal W와 DNASIS 프로그램을 이용하였다.

결 과

1. 로타바이러스 RNA 추출 및 RT-PCR

심한 설사증상을 보이는 송아지 설사분변에 함유되어 있는 로타바이러스 (CBNU-2)와 이 바이러스를 75대 계대배양한 로타바이러스 (CBNU-1)의 핵산을 추출하여 전기영동을 한 결과 로타바이러스의 특유의 11개 분절로 된 RNA를 관찰할 수 있었다 (Figure 1).

CBNU-1과 CBNU-2에서 추출된 RNA를 NSP4 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 751 bp 크기의 NSP4가 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

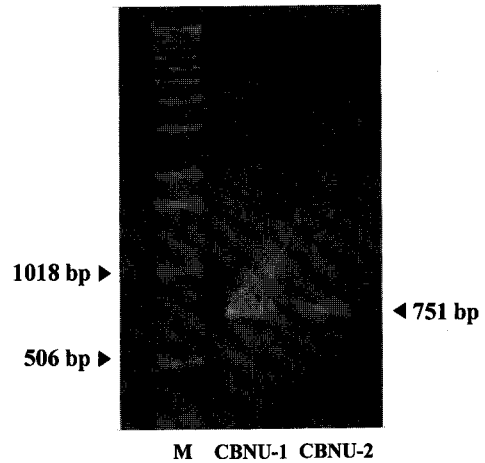


Figure 2. RT-PCR products of bovine rotavirus NSP4 gene. M: 1 kb DNA ladder, CBNU-1: cell-culture adapted bovine rotavirus/isolated from CBNU-2 and 75 times passaged on MA104 cells, CBNU-2: virulent bovine rotavirus/diarrheic fecal sample.

2. NSP4 유전자 염기서열 분석

국내분리주인 CBNU-1과 CBNU-2의 NSP4 유전자 차이를 알아보고 표준주 (UK, SA11, OSU, Wa)와의 유사성을 알아보기 위하여 NSP4 유전자의 염기서열 및 추정아미노산 서열을 비교 분석하였다.

국내분리주 CBNU-1과 CBNU-2의 NSP4 유전자 염기서열을 dideoxy chain termination DNA sequencing 방법으로 결정한 결과, NSP4 유전자가 751개의 염기로 구성되어 있음을 확인하였으며 두 개의 glycosylation site (base 124-135, 154-165)가 존재하는 것을 확인하였다. 표준주는 GenBank에서 염기서열을 다운로드 받았으며 Clustal W 프로그램을 이용하여 CBNU-1, CBNU-2와 표준주의 염기서열을 비교한 결과, CBNU-1과 CBNU-2는 6개 부위 (274, 296, 391, 394, 396, 579)에서 염기의 차이를 보였다 (Figure 3). 또한 CBNU-1과 CBNU-2는 99%의 일치성을 보였으며, CBNU-1의 경우 UK, SA11, OSU 그리고 Wa와는 각각 94.3%, 90.1%, 77.9%, 그리고 79.5%의 일치성을 보였으며 CBNU-2는 각각 93.5%, 89.5%, 76.9%, 그리고 78.5%의 일치성을 보였다 (Table 2).

아미노산 서열을 추정한 결과 NSP4 유전자는 base 42에서 시작하여 base 569를 끝으로 175개의 아미노산을 encode하는 한 개의 open reading

Table 2. Comparison of nucleotide sequence homology of NSP4 genes from Korean bovine rotavirus isolates and reference strains

Strains*	Similarity (%)					
	CBNU-1	CBNU-2	UK	SA11	Wa	OSU
CBNU-1	.	99.0	94.3	90.1	79.3	77.7
CBNU-2		.	93.5	89.5	78.5	76.9
UK			.	89.9	78.8	77.3
SA11				.	78.7	77.5
Wa					.	89.7
OSU						.

*CBNU-1: cell-culture adapted bovine rotavirus (GenBank accession No. AF166353), CBNU-2: virulent bovine rotavirus (AF166354), UK: bovine rotavirus (M21885), SA11: simian rotavirus (K01138), Wa: human rotavirus (D88831), OSU: porcine rotavirus (K02032)

Table 3. Comparison of amino acid sequence homology of NSP4 between Korean bovine rotavirus isolates and reference strains

Strains*	Similarity (%)					
	CBNU-1	CBNU-2	UK	SA11	Wa	OSU
CBNU-1	.	97.7	97.1	93.1	84.0	85.1
CBNU-2		.	94.9	90.9	81.7	82.9
UK			.	92.0	84.0	85.1
SA11				.	81.7	82.9
Wa					.	94.3
OSU						.

*CBNU-1: cell-culture adapted bovine rotavirus, CBNU-2: virulent bovine rotavirus, UK: bovine rotavirus, SA11: simian rotavirus, Wa: human rotavirus, OSU: porcine rotavirus

frame이 존재하고 있음을 확인하였다. 또한 CBNU-1과 CBNU-2는 아미노산 서열 78, 85, 117, 118 등 4개의 부위에서 차이가 있음이 확인되었으며 97.7%의 일치성을 보였다 (Table 3). 그리고 175개의 아미노산을 표준주의 아미노산과 비교 분석한 결과 CBNU-1은 UK, SA11, OSU, 그리고 Wa와는 각각의 경우 97.1%, 93.1%, 85.1%, 84.0%의 일치성을 보였으며, CBNU-2는 각각 94.9%, 90.9%, 82.9%, 81.7%의 일치성을 보였다 (Table 3).

고 찰

본 연구에서는 소 로타바이러스의 NSP4 유전자에서 병원성과 관련된 부위와 최근 돼지 로타

바이러스의 NSP4 유전자 중 병원성과 관련이 있다고 보고된 부위와의 관계를 확인하고 NSP4의 특성을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 즉, 심한 설사증상을 보이는 송아지 분변에 함유되어 있는 로타바이러스 (CBNU-2)와 이를 계대배양을 통해 약독화되었을 것으로 추정되는 바이러스 (CBNU-1)의 염기서열 분석 결과, CBNU-1과 CBNU-2의 NSP4 유전자는 751개의 핵산으로 구성되어 있으며 175개의 아미노산을 coding하는 1개의 open reading frame과 2개의 glycosylation 부위가 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 CBNU-1과 CBNU-2는 6개의 염기 (274, 296, 391, 394, 396, 579)에서 차이를 보였으며 99%의 염기서열 일치성이 있음을 확인할 수 있었다.

백명순 등: 국내분리 소 로타바이러스 NSP4 유전자의 크로닝 및 염기서열 분석

60

Wa GGCTTTTAAAA-GTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGATAAGCTTGCCGAC
 SA11 GGGTTTTAAAA-GTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGAAAAGCTTACCGAC
 OSU GGCTTTTAAAA-GTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGATAAGCTTGCCGAC
 UK GGCTTTTAAAAAGTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGAAAAGCTTACCGAC
 CBNU-1 GGCCTTTTAAAA-GTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGAAAAGCTTACCGAC
 CBNU-2 GGCCTTTTAAAA-GTTCTGTTCCGAGAGAGCGCGTGCAGAAAGATGGAAAAGCTTACCGAC
 ** *****

120

Wa CTCAACTACACATTGAGTGTAACTTCAATGAATGACACATTGCATTCTATAATTCAA
 SA11 CTCAATTATACATTGAGTGTAACTTCAATGAACAATACATTGCACACAATACTTGAG
 OSU CTCAATTACACATTGAGCGTAATCACTTTAATGAATGACACACTACACTCTATTATTCAA
 UK CTCAACTATACATTGAGTGTAACTTCAATGAACAGCACATTGCACACGATACTTGAG
 CBNU-1 CTCAACTATACATTGAGCGTAATCACTTCAATGAACAGCACATTGCACACGATACTTGAA
 CBNU-2 CTCAACTATACATTGAGCGTAATCACTTCAATGAACAGCACATTGCACACGATACTTGAA

180

Wa GATCCIGGAATGGCGTATTTCTATATATGTCATCTGTCTAACAGTTTGTTCACATTA
 SA11 GATCCAGGAATGGCGTATTTCTTATATAGCATCTGTCTAACAGTTTGTTTGGCGTA
 OSU GATCCAGGAATGGCGTATTTCCATATATGTCATCTGTCTGACTGTTTATTACTCTA
 UK GATCCAGGGATGGCGTATTTCTTATATAGTATCTGTCTAACAGTTTGTTCACGTTG
 CBNU-1 GATCCGGGGATGGCGTATTTCTTATATAGCATCTGTCTAACAGTTTGTTTACGTTG
 CBNU-2 GATCCGGGGATGGCGTATTTCTTATATAGCATCTGTCTAACAGTTTGTTTACGTTG

240

Wa CATAAAGCTTCAATCCAACCATGAAAATAGCATTGAAAACATCAAATGTTTCATATAAA
 SA11 AATAAAGCATCCATCCAACAATGAAAATGCAATGAAAACGTCAAAATGTTTCATATAAA
 OSU CATAAAGCATCAATCCAACAATGAAAATAGCGTTAAAACGTCAAAAGTTCGTACAAA
 UK CACAAAGCATCTATCCAACAATGAAAATGCACTAAAGACATCCAATGTTTCATATAAA
 CBNU-1 CACAAAGCGTCTATCCAACAATGAAAATGCACTAAAGACATCCAATGTTTCATATAAG
 CBNU-2 CACAAAGCGTCTATCCAACAATGAAAATGCACTAAAGACATCCAATGTTTCATATAAG
 * *****

300

Wa GTGATTAATATTGTATAGTCACGATCATTAACTCTTTTAAAATTGGCTGGATATAAA
 SA11 GTGGTGAATATTGTATTGTAACAATTTTAAATACGTTGTTAAAATTGGCAGTTATAAA
 OSU GTAATTAATATTGCATGGTTACAATCATTAACTCTTCTGAAAGTGGCTGGTTATAAA
 UK GTGGTGAAGTATTGTATTGTAACAATTTTCAATACGTTGTTAAAATTGGCAGTTATAAA
 CBNU-1 GTGGTGAAGTATTGTATTGTAACAATTTTCAATACGTTGTTAAAATTGGCAGTTATAAA
 CBNU-2 GTGGTGAAGTATTGTATTGTAACAATTTTCAATCCGTTGTTAAAATTGGCAGTTCTAAA
 ** * *****

Figure 3. Continued

```

                                                    360
Wa      GAGCAGGTTACTACAAAAGACGAAATTGAGCAACAGATGGACAGAATTGTGAAAGAGATG
SA11    GAGCAGATAACTACTAAAGATGAGATAGAAAAGCAAATGGACAGAGTAGTCAAAGAATG
OSU     GAACAGGTTACTACTAAGGATGAAATTGAACAACAGATGGACAGAATTATTAAGAGATG
UK      GAACAGATTACTACTAAAGATGAGATAGAAAAGCAAATGGACAGGGTAGTCAAAGAGATG
CBNU-1  GAACAGATTACTACTAAAGACGAGATAGAGAAGCAAATGGACAGAGTAGTCAAAGAGATG
CBNU-2  GAACAGATTACTACTAAAGACGAGATAGAGAAGCAAATGGACAGAGTAGTCAAAGAGATG
** *** * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                                    420
Wa      AGACGTCAGCTGGAGATGATTGATAAACTAACTACTCGTGAAATTGAACAGGTTGAATTG
SA11    AGACGCCAGCTAGAAATGATTGACAAATTGACTACACGTGAAATTGAACAAGTAGAGTTG
OSU     AGACGTCAACTGGAAATGATTGACAAATTGACGACTCGTGAAATTGAACAGGTTGAATTA
UK      AGACGTCAGCTAGAAATGATTGATAAGTTGACTACACGTGAAATTGAGCAGGTTGAATTG
CBNU-1  AGACGTCAGCTAGAAATGATTGATAAGTTGACTACACGTGAGATCGAACAGGTTGAATTG
CBNU-2  AGACGTCAGCTAGAAATGATTGATAAGTTGCCCTCCCCGTGAGATCGAACAGGTTGAATTG
***** ** * * * * ***** ** * * * * ***** ** * * * * * * * *

                                                    480
Wa      CTTAAACGTATACATGACAACCTGATAACTAGACCAGTTGACGTTATAGATATGTCGAAG
SA11    CTTAAACGCATTTACGATAAAATTGACGGTGCAAACGACAGGCCAAATAGATATGACAAA
OSU     CTTAAACGTATACATGACAAATTAGCTGCTAGATCAGTTGACGCTATAGATATGTCGAAA
UK      CTTAAACGCATTCACGATAAAATTAATGATACGAACAGTAGACGAAATAGATATGACGAAG
CBNU-1  TTGAAACGTATTTACGATAAAATTGATGATACGAACAGCAGACGAGATAGATATGACGAAA
CBNU-2  TTGAAACGTATTTACGATAAAATTGATGATACGAACAGCAGACGAGATAGATATGACGAAA
* ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                                    540
Wa      GAATTC AATCAGAAAAACATCAAACGCTAGATGAATGGGAGAGTGGAAAAATCCATAT
SA11    GAGATCAATCAAAAAACGTGAGAACGCTAGAGAATGGGAAAAGTGGAAAAATCCTTAT
OSU     GAATTTAATCAGAAAAATATTGAAACGCTAGATGAATGGGAAAAGTGGAAAAATCCATAT
UK      GAAATTAACCAAAAAGAACGTGAGAACGCTAGAGAATGGGAAAAGTGGAAAGAAATCCTTAT
CBNU-1  GAAATCAACCAAAAAGAACGTGAGAACGCTAAAAGAATGGGAAAAGTGGAAAGAAATCCTTAT
CBNU-2  GAAATCAACCAAAAAGAACGTGAGAACGCTAAAAGAATGGGAAAAGTGGAAAGAAATCCTTAT
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                                    600
Wa      GAACCGTCAGAAGTGACTGCATCCATGTGAGAGGTTGAGTTACCGTCGTCGTCTTCGGA
SA11    GAACCAAGAGAAGTGACTGCAGCAATGTAAGAGGTTGAGCTGCCGTCGACTGTCTTCGGA
OSU     GAACCGTCGGAAGTAACTGCGTCTATGTGAGAGGTTGAGTTGCCGTCGTCGTCTTCGGA
UK      GAACCAAAAAGAAGTGACTGCAGCAATGTAAGAGGTTGA-CTGCCGTCGACTGTCTTCGGA
CBNU-1  GAACCAAAAAGAAGTGACTGCGGCAATGTAAGAGGTTGAACTGCCGTCGACTGTCTTCGGA
CBNU-2  GAACCAAAAAGAAGTGACTGCGGCAATGTAAGAGGTTGAGCTGCCGTCGACTGTCTTCGGA
***** ***** ***** * * * * ***** * ***** ***** *****

```


4A임을 알 수 있다.

Zhang 등 [29]은 병원성이 강한 돼지 로타바이러스와 이를 약독화시킨 바이러스의 NSP4 유전자를 비교 분석한 결과, 염기서열 432-461 (아미노산 131-140)부위에서 두 바이러스 차이에 근거하여 이 부위가 병원성과 관련이 있다고 보고하였다. 또한 baculovirus expression system을 사용하여 발현시킨 후 단백질을 순수분리하여 병원성이 강한 돼지 로타바이러스의 NSP4만을 장 상피세포에 적용한 결과 세포 내 calcium 농도가 적용 경로에 따라 6~10배 정도의 상승효과를 보였으며 신생마우스에 적용시 설사가 유발되는 개체수가 약독화 NSP4 적용시보다 높은 수치를 보임으로 이 부위가 병원성과 관련이 있음을 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 국내 소 로타바이러스 (CBNU-1과 CBNU-2) NSP4의 염기서열과 추정아미노산 서열의 비교시 단지 염기서열 (274, 296, 391, 394, 396, 579)에서 차이를 보였을 뿐 Zang 등 [29]의 결과에서 차이를 보이는 부위인 염기서열 432-461 (아미노산 131-140)에서는 어떠한 차이도 관찰할 수 없었다. 이는 본 실험에 사용한 CBNU-2를 MA104 cell에 75대 계대배양하여 약독화되었을 것으로 추정된 바이러스 즉, CBNU-1이 75대 계대배양으로 아직 약독화되지 않았거나 소 로타바이러스의 NSP4에 있어 병원성과 관련된 부위가 돼지 로타바이러스와 다를 수 있는 것으로 추정할 수 있었다. 이러한 점을 확인하기 위하여 CBNU-1과 CBNU-2가 germ free 송아지에서 병원성의 차이가 있는지 확인되어야 할 것이다. 따라서 CBNU-1과 CBNU-2를 expression하여 비구조 단백질의 생화학적 성상을 규명하기 위한 실험과 발현된 CBNU-1과 CBNU-2의 NSP4에서 차이를 보이는 부위의 peptide만을 순수분리한 뒤 germ free 송아지를 이용한 in vivo 실험이 실시되어야 할 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서 최근 대두되고 있는 로타바이러스의 NSP4 유전자에 대한 염기서열과 아미노산 서열을 비교 분석한 결과는 국내 소 로타바이러스의 감염에 대한 이해와 NSP4 유전자의 분자생물학적 특성을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국과학재단 핵심전문연구비 (과제번호: 981-0613-066-2)에 의하여 수행되었음.

참고 문헌

- 1) 전성진, 장정호, 정정원, 김원용, 강신영: RT-PCR과 RFLP법을 이용한 국내 소 로타바이러스 VP4 및 VP7 유전자의 특성 규명. *J Kor Soc Virol* **28**: 165-174, 1998.
- 2) Ball JM, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK: Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272**: 101-104, 1996.
- 3) Bican P, Cohen J, Charpilienne A, Scherrer R: Purification and characterization of bovine rotaviruses cores. *J Virol* **43**: 1113-1117, 1982.
- 4) Both GW, Siegman LJ, Bellamy AR, Atkinson P: Coding assignment and nucleotide sequences of simian rotavirus SA11 gene segment 10; Location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J Virol* **48**: 335-339, 1983.
- 5) Bridger JC: Novel rotaviruses in animals and man. *Ciba Found Symp* **128**: 5-23, 1987.
- 6) Burke B, McCrae MA, Desselberger U: Sequence analysis of two porcine rotaviruses differing in growth in vitro and in pathogenicity; distinct VP4 sequences and conservation of NS 53, VP6 and VP7 genes. *J Gen Virol* **75**: 2205-2212, 1994.
- 7) Burns JW, Chen D, Estes MK, Ramig RF: Biological and immunological characterization of a simian rotavirus SA11 variant with an altered genome segment 4. *Virology* **169**: 427-435, 1989.
- 8) Caust J, Dyal-Smith ML, Lazdins I, Holmes IH: Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch Virol* **96**: 123-134, 1987.
- 9) Chowdhury K: One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **19**: 2792, 1991.
- 10) Dong YJ, Zeng CQY, Ball JM, Estes MK, Morris AP: The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C mediated inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc*

- Natl Acad Sci USA* **94**: 3960-3965, 1997.
- 11) **Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF**: Rotaviruses; a review. *Curr Top Microbiol Immunol* **105**: 123-184, 1983.
 - 12) **Estes MK, Cohen J**: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**: 410-449, 1989.
 - 13) **Fijtman NL, Barrandeguy ME, Cornaglia EM, Schudel AA**: Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. *Arch Virol* **96**: 275-281, 1987.
 - 14) **Glass RI, Keith J, Nakagomi O, Nakagomi T, Askaa J, Kapikian AZ, Chanock RM, Flores J**: Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska Calf Diarrhea Virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. *Virology* **141**: 292-298, 1985.
 - 15) **Huang J, Nagesha HS, Snodgrass DR, Holmes IH**: Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *J Clin Microbiol* **30**: 85-92, 1992.
 - 16) **Jiang BM, Qian Y, Tsunemitsu H, Green KY, Saif LJ**: Analysis of the gene encoding the outer capsid glycoprotein (VP7) of group C rotaviruses by northern and dot blot hybridization. *Virology* **184**: 433-436, 1991.
 - 17) **Kirwood CD, Palombo EA**: Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* **236**: 258-265, 1997.
 - 18) **Kohli E, Maurice L, Bourgeois C, Bour JB, Pothier P**: Epitope mapping of the major inner capsid protein of group A rotavirus using peptide synthesis. *Virology* **194**: 110-116, 1993.
 - 19) **Lazdins I, Coulson BS, Kirkwood C, Dyal-Smith M, Masendycz PJ, Sonza S, Holmes IH**: Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7. *Virology* **209**: 80-89, 1995.
 - 20) **Lemon AD, Barbara ES, William LM, Sylvie D, David JT**: Diseases of Swine, 7th edition. *Iowa State University Press Ames* pp. 331-348, 1992.
 - 21) **Lu W, Duhamel GE, Hoshino Y, Benfield DA, Nelson EA, Hesse RA**: Characterization of the bovine group A rotavirus strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-Cody (NCDV-Cody). *J Clin Microbiol* **33**: 990-994, 1995.
 - 22) **Rosen BI, Parwani AV, Gorziglia M, Laralde G, Saif LJ**: Characterization of full-length and polymerase chain reaction-derived partial length Gottfried and OSU gene 4 probes for serotypic differentiation of porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol* **30**: 2644-2652, 1992.
 - 23) **Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J, Saif LJ**: Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J Clin Microbiol* **32**: 311-317, 1994.
 - 24) **Ruggeri FM, Greenberg HB**: Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* **65**: 2211-2219, 1991.
 - 25) **Tian P, Ball JM, Zeng CQY, Estes MK**: The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* **70**: 6973-6981, 1996.
 - 26) **Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK**: The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol* **68**: 251-257, 1994.
 - 27) **Tsunemitsu HB, Jiang BM, Saif LJ**: Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* **30**: 2129-2134, 1992.
 - 28) **Tsunemitsu H, Jiang BM, Yamashita Y, Oseto M, Ushijima H, Saif LJ**: Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses. *J Clin Microbiol* **30**: 3009-3012, 1992.
 - 29) **Zhang M, Zeng CQY, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK**: Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* **72**: 3666-3672, 1998.