

## 한탄바이러스의 Nucleocapsid Protein 발현에 있어 S Genome 내 Noncoding Region의 역할

국립보건원 바이러스 질환부 신경계 바이러스과, 고려대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1</sup>

유정희 · 이연승 · 이호동 · 박 찬 · 박근용\* · 이평우<sup>1</sup>

=Abstract=

### The Role of Noncoding Region in Hantaan Viral S Genome for Expression of Nucleocapsid Protein

Cheong-Hee Yu, Yeon-Seung Lee, Ho-Dong Lee, Chan Park,  
Keun-Yong Park\* and Pyung-Woo Lee<sup>1</sup>

*Division of Arbovirus, Department of Virology, National Institute of Health,  
Department of Microbiology, College of Medicine, Korea University<sup>1</sup>*

The genome of Hantaan virus, the prototype of the *hantavirus* genus, is composed of three segmented, single stranded negative sense RNA genome. The 5' and 3' termini of the Hantaan virus RNA genome contain noncoding regions (NCRs) that are highly conserved and complementary to form panhandle structures. There are some reports that these NCRs seems to control gene expression and viral replication in influenza virus and vesicular stomatitis virus. In this study, we examined whether NCRs in Hantaan virus play a role in expression of the viral nucleocapsid protein (Np) and foreign (luciferase) gene. The 5' and/or 3' NCR-deleted mutants were constructed and analysed. The Np expression of 5' NCR-deleted clone was similar to that of the clone containing full S genome. In the case of 3' NCR-deleted clone, it showed 40% reduction. To investigate the role of NCR in foreign gene expression, the clones which are replaced ORF of Hantaan viral Np gene with that of luciferase gene were constructed. The results were similar to those of the experiments using Np gene. These results suggest that 3' NCR is more important than 5' NCR in protein expression. To find out a critical region of 3' NCR in protein expression, several clones with a deleted part of 3' NCR were constructed and analyzed. The deletion of the conserved region in 3' NCR showed 20~30% decrease in Np expression. However there were no change in luciferase activities between clones with or without non-conserved region of 3' NCR. These results suggest that the 3' NCR of Hantaan virus S genome, especially conserved region in 3' NCR, plays an important role in the expression of Hantaan viral Np and foreign genes.

**Key Words:** Hantaan virus, Noncoding region (NCR), Nucleocapsid protein (Np), Luciferase

접수 : 2000년 3월 18일, 논문게재확정 : 2000년 4월 12일

\* 책임저자: 박근용, 122-704, 서울시 은평구 녹번동 5번지 국립보건원 바이러스질환부 신경계바이러스과  
Tel: 02) 380-1498~9, Fax: 02) 380-1499, E-mail: pkysae@nih.go.kr

## 서 론

한탄바이러스 (Hantaan virus)는 분야바이러스과 (Family *Bunyaviridae*), 한타바이러스속 (Genus *Hantavirus*)의 prototype 바이러스이며 [17,18], 감염된 등줄쥐 (*Apodemus agrarius coreae*)의 배설물 및 분비물과 함께 채외로 배출된 바이러스는 등줄쥐의 서식지 내 오염된 토양의 먼지와 더불어 호흡기를 통해 흡입, 감염됨으로서 중증의 신증후출혈열 (Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: HFRS)을 일으키며 치사율은 5~10%에 이른다 [13].

한탄바이러스의 형태는 *Bunyaviridae*에 속한 다른 바이러스들처럼 외피 (envelope)를 보유하며, 직경이 약 100 nm의 구형이다. 바이러스 게놈은 3개의 negative sense, single-stranded RNA 분절로 구성되어 있으며, RNA는 nucleocapsid protein (Np)으로 둘러싸여 있으며 각각의 분절들은 그 크기에 따라 L (large), M (medium), S (small) 분절로 명명된다. 6.5 kb 크기의 L 분절에는 RNA-dependent RNA polymerase의 합성 정보가 암호화되어 있어 바이러스 핵산의 전사와 복제에 관여한다 [1,12]. 3.6 kb의 M 분절은 두 개의 당단백질 (G1과 G2)의 합성 정보를 암호화하고 있는데, 이 두 단백질들은 외피 밖으로 돌출하는 돌기 (peplomer)를 구성하며, 중화항체를 유도함으로써 바이러스의 혈청형 특이 항원성을 결정하는 것으로 알려져 있다 [1,3,19,21]. 1.7 kb의 S 분절은 nucleocapsid protein (Np)의 합성 정보를 암호화한다 [1]. 각 RNA 게놈 분절은 Np와 결합함으로써 ribonucleoprotein (RNP) complex를 형성하며, 게놈의 복제와 mRNA 합성을 위한 주형이 된다 [9].

한탄바이러스의 S 분절은 하나의 open reading frame (ORF)를 포함하고 있으며, genomic sense로서 ORF의 양단에 upstream 쪽으로 36 nucleotides의 3' noncoding region (NCR)과 downstream 쪽으로 370 nucleotides의 5' NCR이 존재한다 [5]. 한탄바이러스의 L과 M 분절도 각각 하나의 ORF를 포함하고 있으며 L 분절은 3'에 38 nucleotide와 5'에 43 nucleotide의 NCR을 포함하고 있으며, M 분절도 3'에 40 nucleotide, 5'에 168 nucleotide의 NCR이 존재한다. 각 분절의 NCR 말단은 14-17 nucleotide의 보존적 염기서열을 가지고 있으며, 이 부위는 염기서열 상보성으로 인하여 각 RNA 분절은 panhandle 구조를 형성할 것으로 믿어진다 [26]. 이

러한 panhandle structure는 influenza virus (INFLUENZA)와 vesicular stomatitis virus (VSV)에서도 나타나며, 이 구조가 RNA 전사와 바이러스 복제에 관여한다고 보고된 바 있다 [11, 15, 23]. 한탄바이러스의 NCR 말단에 존재하는 보존적 염기서열과 panhandle 구조 또한 유전자 발현이나 바이러스 증식에 관여하는 조절 신호로 작용하여 중요한 조절 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. S 분절의 NCR들이 유전자 발현에 어떤 영향을 주는지가 밝혀진다면 L 분절이나 M 분절의 유전자 발현 조절 기작을 규명하는 일도 용이하리라 생각된다. 또한 cis-acting element로서의 NCR의 조절 기작이 한탄바이러스에서도 그러한지 또는 그렇지 아니한지를 확인해 볼 수 있을 것이다.

지금까지 한탄바이러스에 관한 역학적 및 혈청학적, 바이러스학적 측면에서의 연구는 많은 진전이 있어 왔으나, 바이러스의 숙주 세포 내에서의 전사 및 단백질 합성, 조립 등 증식에 관련된 유전자 발현과 그 조절에 관한 분자 및 유전자 수준에서의 연구는 그다지 많지 않았다. 따라서 한탄바이러스가 숙주에 감염한 후 새로운 자손 바이러스를 만들기까지 바이러스의 유전자가 어떠한 조절작용으로 발현되는가를 분자 및 유전자 수준에서 규명하는 일은 흥미있는 일이다. 이미 INFLUENZA와 VSV에 관한 몇몇 보고를 통해 유전자 말단에 존재하는 상보적인 염기서열들이 유전자 발현에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 바, 본 연구에서는 한탄바이러스의 S 분절의 5'과 3' NCR이 Np 유전자 발현 및 조절에 관여하는지의 여부와 나아가 NCR의 어떤 부분이 보다 중요한 역할을 하는지를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스와 세포 배양

-70℃에서 냉동 보관중인 한탄바이러스 (76-118주) seed를 Vero E6 세포 (CRL 1586) (ATCC, Rockville, MD, USA)에 접종, 5% fetal bovine serum이 함유된 EMEM (Eagle's MEM, Gibco-BRL, MD, USA)으로 37℃의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 7일간 배양하였다. 그 후 바이러스의 증식이 확인된 세포의 배양액을 소량씩 분주, -70℃ 이하에서 냉동 보관하여 본 실험에 사용하였다.

**Table 1.** Synthetic oligonucleotides used as primers for amplification of Hantaan virus S segment clones

Primers	Polarity (antigenomic strand)	Sequences (5' → 3')	Constructed clones using the primers
HTN-BglII	F <sup>1)</sup>	TGGATAGATCTTAGTAGTAGACTCCCTAAAGAGCTA	pMTA-SF pMTA-S5' pGEM-LucSF pGEM-LucS5' pGEM-LucSF5' Δ
HS-EcoR I	R <sup>2)</sup>	CCCGGAATTCTAGTAGTATGCTCCCTAA	pMTA-SF pGEM-LucSF pGEM-LucSF5' Δ
HTN-ORF I	F	GCTACTAGATCTAGATGGC	pMTA-S5' Δ
HTN-ORF II	F	ATGGCAACTATGGAGGAA	pMTA-S3' pMTA-SORF
HS-ORF-RI	R	CATTCATTATCTAGAGTTTCAAAGG	pMTA-S5' pMTA-SORF
5'-Luc-BamH	F	CGCGGATCCATGGAAGACGCC	pGEM-LucS3' pGEM-Luc
3'-Luc-BamH	R	CGCGGATCCACACGGCGATCTT	pGEM-Luc

1) Forward, 2) Reverse

**Table 2.** Description of constructed Hantaan virus S segment and luciferase gene derivative clones

Clones	Description
pMTA-SF	: 5', 3' NCR and Np ORF (whole S genome)
pMTA-S5'	: 5' NCR and Np ORF (deletion of 3' NCR)
pMTA-S3'	: 3' NCR and Np ORF (deletion of 5' NCR)
pMTA-S3' Δ 1-21	: non-conserved region in 3' NCR and Np ORF
pMTA-SORF	: Np ORF only
pGEM-LucSF	: 5', 3' NCR and substituted luciferase ORF for Np ORF
pGEM-LucS5'	: 5' NCR and substituted luciferase ORF for Np ORF
pGEM-LucS3'	: 3' NCR and substituted luciferase ORF for Np ORF
pGEM-LucS3' Δ 26-36	: 5' NCR, conserved region of 3' NCR and luciferase ORF
pGEM-Luc	: luciferase ORF only

## 2. Viral RNA의 분리와 cDNA 합성

바이러스 감염 7일째의 세포 배양액을 채취, 저속 원심한 상층액 560 μl를 Qiagen viral RNA purification kit (Qiagen, CA, USA)을 사용하여 viral RNA를 분리하였다. cDNA의 합성에 사용한 primer는 이미 알려진 한탄바이러스 S 분절의 염기

서열에 기초하여 NCR을 포함 (Table 1.) 하도록 합성하였으며, cDNA의 합성은 viral RNA template와 dNTPs, RNase inhibitor의 mixture에 primer를 가하고 70℃에서 5분간 가온하였다. 그 후 Superscript II Reverse transcriptase (Gibco-BRL, MD, USA) 1 unit를 가하고 23℃ 15분, 42℃ 60분, 95℃ 5분으로 Perkin-Elmer thermo cycler로 1 cycling하여 합성하

였다.

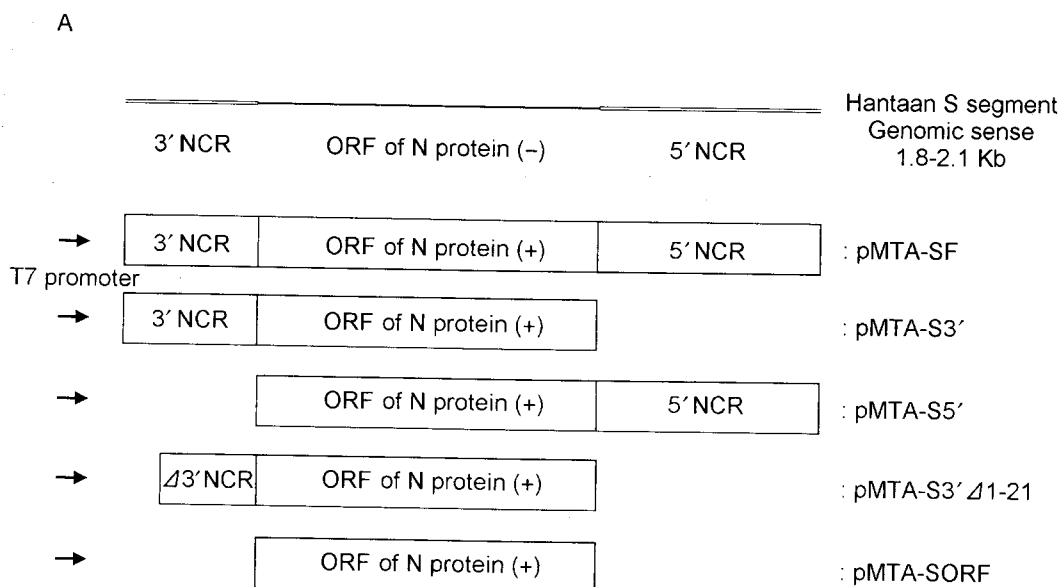
### 3. 한탄바이러스 S 분절 포함 clone들의 제작

한탄바이러스의 S 분절을 위시하여 각종 유전자 clone들의 제작을 위하여 TA vector이면서 동시에 진핵 세포에서 발현이 가능한 vector인 pCR3.1 (Invitrogen)을 사용하였다. 위에서처럼 PCR로 증폭시킨 NCR을 포함하는 cDNA를 pCR3.1에 ligation 시키고 transformation 후 생성된 colony를 선택, restriction enzyme으로 확인한 clone을 pMTA-SF로 명명하였다. Deletion clone들은 pMTA-SF를

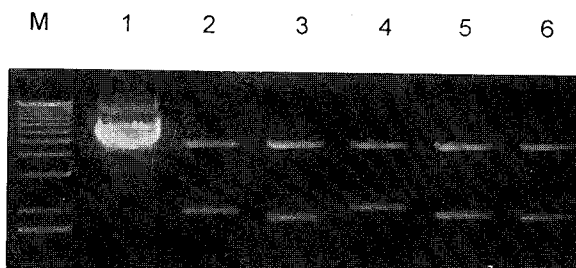
template로 하여 3' 및 5' NCR을 deletion 시키는 primer (Table 1.)를 이용, PCR로 증폭시켜 cloning 하였다. 이렇게 제작한 각 clone들의 성상은 Table 2.에 요약하였다. 또한 이 clone들의 염기서열은 automatic sequencer (ABI, model 310, USA)로 sequencing하여 확인하였다.

### 4. Luciferase gene 포함 clone의 제작

한탄바이러스 S 분절의 NCR 염기서열을 포함하는 primer로 pGL3-Basic DNA (Promega, GenBank/EMBL Accession No. U47295)를 template로 하여 한



B



**Figure 1.** Construction of HTNV S segment derivative clones including Hantaan virus Np ORF. **A)** Genomic structures of Hantaan virus S segment and constructed clones. **B)** Cleavag2e patterns of the derivative clones from the Hantaan virus S segment digested with *Kpn I* and *EcoR V*. M: 1 k bp ladder (Gibco-BRL), Lane 1: pCR 3.1 vector, Lane 2: pMTA-SF, Lane 3: pMTA-S3', Lane 4: pMTA-S3' Δ 1-21, Lane 5: pMTA-S5', Lane 6: pMTA-SORF.

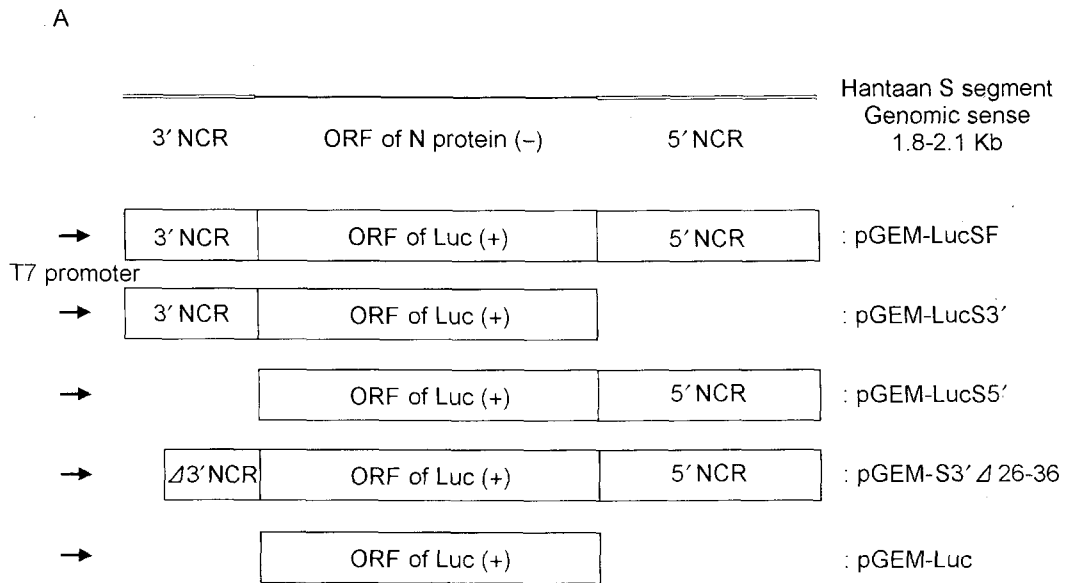
탄바이러스 S 분절 양말단의 NCR을 포함하면서 Np ORF를 luciferase 유전자로 대체한 clone을 pGEM-T easy vector에 cloning 하였으며, 그 특성은 Table 2.에 요약하였다. 각 clone의 염기서열은 automatic sequencer (ABI model 310, USA)로 sequencing하여 확인하였다.

5. DNA transfection

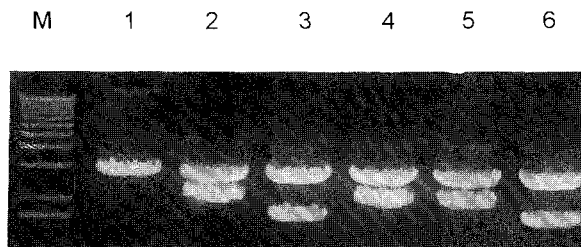
Vero E6 cell을 35mm dish에 50~80% confluent 하게 배양한 후, 여기에 1 m.o.i.의 recombinant vaccinia virus (vTF7-3)를 감염시키고 lipofectamine (Gibco-BRL, MD, USA)을 사용하여 DNA를 transfection 시켰다.

6. Western blot

각 DNA clone들을 transfection한 세포는 48 시간 후 RIPA buffer (1% Triton X-100, 0.5% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF)로 세포들을 lysis시켜 단백질을 추출한 다음 각 추출액에 함유된 단백질량을 Lowry method로 측정하였다. 단백질 정량 후, 단백질 추출액은 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk를 함유하는 TBS buffer로 blocking한 후, 1차 항체는 한탄 바이러스 Np의 단클론 항체를 희석 (1:1000)하여 사용하였고 2차 항체는 anti-mouse IgG alkaline



B

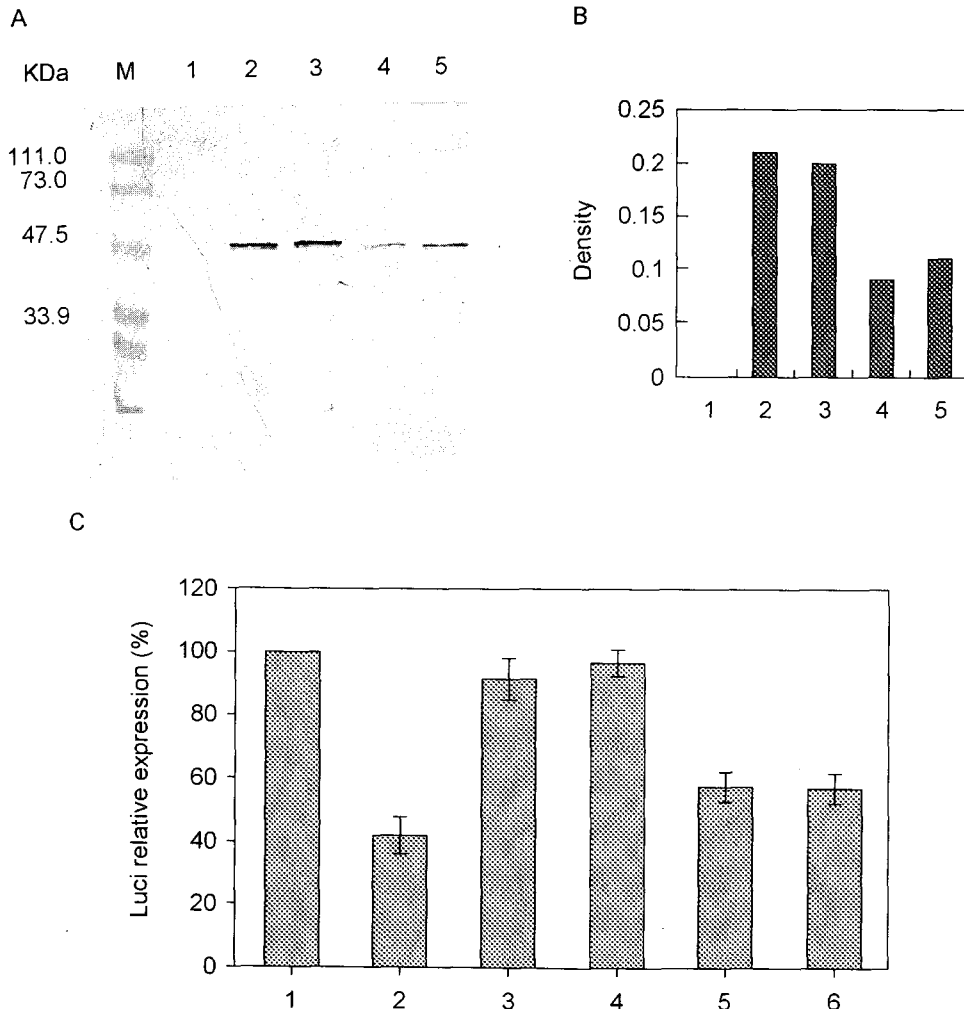


**Figure 2.** Construction of the substituted clones of Np ORF with luciferase gene. **A)** Genomic structures of Hantaan virus and the clones including luciferase ORF. **B)** Cleavage patterns of luciferase clone derivatives digested with *Kpn I* and *EcoR V*. M: 1 k bp ladder (Gibco-BRL), Lane 1: pGEM-T easy vector, Lane 2: pGEM-LucSF, Lane 3: pGEM-LucS3', Lane 4: pGEM-LucSF3' Δ 26-36, Lane 5: pGEM-LucS5', Lane 6: pGEM-Luc.

phosphatase conjugate (Sigma, Wisconsin, USA) 희석액 (1:1000)을 사용하였다. 4-Nitro-blue tetrazolium chloride (Roche molecular biochemicals, IN, USA)와 X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate (Roche molecular biochemicals, IN, USA)를 이용하여 발색시킨 후 image analyzer (GELDOC 2000, Bio-Rad, USA)를 이용하여 발현된 단백질 band의 intensity를 측정하였다.

### 7. Luciferase assay

DNA transfection 48시간 후에 Luciferase assay system kit (Promega, USA)의 lysis reagent로 세포를 추출하여 상층액을 취하였다. Luciferase assay reagent (Luciferin) 100  $\mu$ l에 상층액 20  $\mu$ l를 가하여 luminome ter로 luciferase activity를 2분 동안 측정하였다.



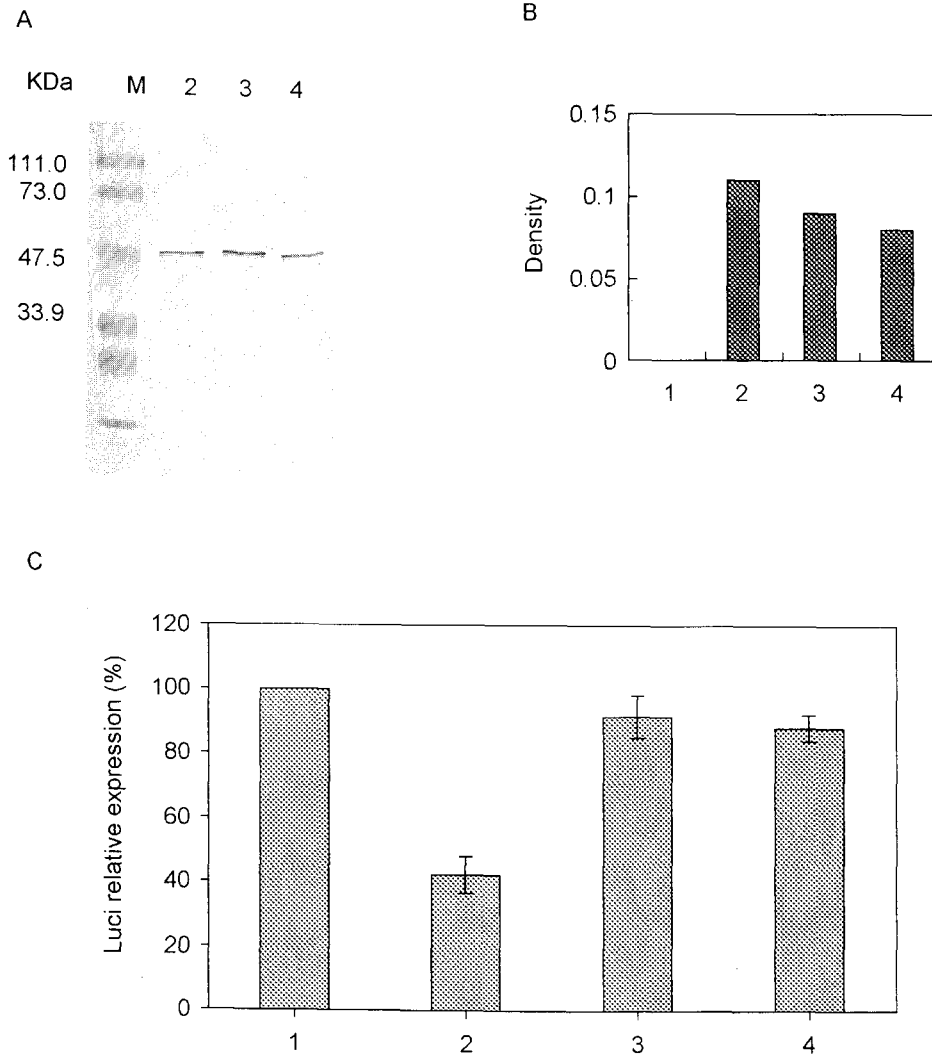
**Figure 3.** The role of 3' and 5' NCR on Np expression and luciferase activity. **A)** Western blot analysis of Np expression in Vero E6 cell infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) and transfected with Np clone derivatives. M: low range protein marker (Bio-Rad), Lane 1: pCR 3.1 vector, Lane 2: pMTA-SF, Lane 3: pMTA-S3', Lane 4: pMTA-S5', Lane 5: pMTA-SORF. **B)** Densitometric representation of Western blot results. 1: pCR 3.1 vector, 2: pMTA-SF, 3: pMTA-S3', 4: pMTA-S5', 5: pMTA-SORF. **C)** Luciferase assay in Vero E6 cells infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) and transfected with luciferase clone derivatives. 1: pGL2-control, 2: pGEM-T-easy vector, 3: pGEM-LucSF, 4: pGEM-LucS3', 5: pGEM-LucS5', 6: pGEM-Luc.

결 과

1. cDNA의 합성과 각 clone 제작

바이러스 배양액에서 추출한 한탄바이러스 S 분절 RNA로부터 cDNA를 합성하고 이를 주형으

로 제작한 각 clone들의 유전자 구조는 Figure 1. A)에 나타내었다. pGEM-LucSF clone은 pGL3-basic DNA를 주형으로 사용, 3'과 5' 말단에 한탄바이러스 S 분절의 NCR을 보유하는 clone으로서 pGEM-T easy vector를 이용하여 제조하였다 (Figure 2. A)). 이렇게 제조한 clone들은 제한효소 처리 후, 1%



**Figure 4.** The role of conserved and nonconserved regions of 3' NCR on Np expression and luciferase activity. **A)** Western blotting analysis of Np expression in Vero E6 cell infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) and transfected with HTNV S segment derivative clones containing nonconserved region of 3' NCR. M: low range protein marker (Bio-Rad), Lane 1: pCR 3.1 vector, Lane 2: pMTA-SF, Lane 3: pMTA-S3', Lane 4: pMTA-S3'  $\Delta$  1-21. **B)** Densitometric representation of Western blot results, 1: pCR 3.1 vector, 2: pMTA-SF, 3: pMTA-S3', 4: pMTA-S3'  $\Delta$  1-21. **C)** Luciferase assay in Vero E6 cell infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) and transfected with luciferase clone derivatives containing conserved region of 3' NCR. 1: pGL 2-control, 2: pGEM-T-easy vector, 3: pGEM-LucSF, 4: pGEM-LucS3'  $\Delta$  26-36.

agarose gel로 전기영동하여 확인하였으며 (Figure 1. B), 2. B)), 또한 T7 primer와 각 clone의 제조시 사용한 reverse primer를 이용하여 각각의 염기서열을 확인하였다 (결과 제시 않았음).

## 2. 각 clone들의 N protein (Np) 발현 비교

pMTA-SF, pMTA-S5', pMTA-S3', pMTA-SORF clone들을 Vero E6 cell에 DNA transfection하여 Np를 발현시킨 후, 그 발현 여부 및 정도를 비교한 결과 pMTA-SORF와 pMTA-S5'은 pMTA-SF에 비하여 발현 정도가 약 40% 정도 떨어지는 것으로 확인되었다. 그러나 pMTA-S3'의 발현 정도는 pMTA-SF와 별 차이가 없는 것으로 나타났다 (Figure 3. A), 3. B)). 이 결과는 한탄바이러스의 Np가 ORF 자체만으로도 발현되기는 하지만 그 upstream 쪽에 위치한 3' NCR의 존재에 의해 Np 발현이 보다 효과적으로 증가되어짐을 의미한다.

## 3. Foreign gene 발현에서의 NCR의 영향

pGEM-Luc series clone들을 Vero E6 cell에 DNA transfection 시킨 후 luciferase activity를 측정하였다. 그 결과 pGEM-Luc clone의 luciferase 활성이 pGEM-LucSF clone에 비하여 약 40% 정도 낮은 것으로 나타났으며 pGEM-LucS5' clone 역시 luciferase 활성이 40% 정도 감소하였다. 반면, pGEM-LucS3' clone의 luciferase 활성은 pGEM-LucSF와 비슷하였다 (Figure 3. C)). 이 결과는 한탄바이러스의 S 분절 NCR은 luciferase 발현에도 영향을 미치며, Np 발현 때와 마찬가지로 3' NCR이 보다 중요하다는 것을 알 수 있다.

## 4. 3' NCR의 보존 부위와 비보존 부위의 역할 비교

이상의 결과들은 Np 발현에 있어 3' NCR이 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 이를 기초로 3' NCR의 보존 부위 (conserved region)와 비보존 부위 (non-conserved region) 중 어느 부위가 더 중요한가를 규명하기 위해 3' NCR 중에서 보존 부위만을 포함하고 있는 clone (pGEM-LucSF3'  $\Delta$ 26-36)의 luciferase 활성을 pGEM-LucSF의 활성과 비교한 결과 별 차이가 없음을 확인하였다 (Figure 4. C)). 그러나 비보존 부위만을 포함하고 있는 clone (pMTA-S3' $\Delta$ 1-21)은 pMTA-SORF와 마찬가지로 Np의 발현이 약 20~30% 정도 낮았다 (Figure 4. A), 4. B)). 이 결과는 한탄바이러스 S 분절

3' NCR의 보존 부위 (3' NCR의 1~20 nucleotide)가 Np 발현이나 이중 단백질 발현에 있어서 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

## 고 찰

한탄바이러스는 3개의 분절로 이루어진 negative sense RNA virus로 각 분절들은 바이러스의 증식에 필수적인 효소 및 구조 단백질들의 유전자를 보유하고 있다. 이 단백질들은 바이러스의 생활환 동안 발현되어 숙주 세포와의 관계에서 감염성과 병원성에 중요한 역할을 한다 [22].

Negative-sense RNA virus의 경우 viral RNA polymerase는 viral RNA에 존재하는 2 종류의 promoter들을 이용하여 RNA를 합성하는데, 합성된 RNA들은 기능 및 정량적으로 차이가 있다. 즉 viral RNA polymerase는 encapsidated genomic RNA의 3' end promoter를 이용하여 mRNA를 합성하고 anti-genomic RNA의 3' end에 존재하는 promoter를 사용하여 positive-sense RNA를 합성한다고 알려져 있다 [14,20]. Hepatitis C virus, VSV, INFV들에서는 3' NCR이 polymerase와 결합하여 transcription과 replication에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다 [2,4,10,14]. 한탄바이러스의 경우 각 분절의 ORF upstream에 존재하는 3' NCR은 한탄바이러스속의 다른 바이러스들과 90% 이상의 sequence homology를 보인다 [6]. 이 부분이 여러 종류의 한탄바이러스에 공존하고 있다는 것으로서 바이러스의 생활환에 있어서 이 부분이 중요한 역할을 수행할 것으로 추정할 수 있다. 그러나 5' NCR은 길이나 sequence homology에 있어서도 다양성을 보이고 있으므로 [16] 바이러스의 기본적 생존 전략의 측면에서 그 중요성이 3' NCR 보다는 낮을 것으로 생각할 수 있다.

본 실험에서는 transcription 과정에 영향을 미치는 것으로 알려진 NCR 부위가 translation 과정에서는 어떤 역할을 하는지, 또한 NCR의 어떤 부분이 보다 중요한 역할을 하는지 알아보하고자 각 NCR을 deletion 시킨 clone들을 제작하고 (Figure 1, 2), 이 clone들을 이용하여 *in vitro*에서 단백질 발현 양상의 차이를 비교하였다. 만들어진 clone들을 Vero E6 cell에 transfection 시키고 일정 시간이 지난 후 세포 내 단백질을 추출하여 Western blot 실험을 통해 발현 정도를 비교하였다. Figure 3. A)와 3. B)에서처럼 ORF만으로도 단백질이 발현될 수



있었다. 그러나 5' NCR을 포함하고 있는 clone에서 단백질 발현이 증가하는 것으로 보아 5' NCR은 단백질 발현을 하는데 있어서 반드시 필요한 부분은 아니지만 이 NCR이 존재함으로 단백질 발현을 약 1.5배 정도 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 3' NCR을 deletion 시킨 clone이 3' NCR을 포함하고 있는 clone에 비하여 단백질 발현 정도가 약 40% 정도 낮아진 것으로 미루어 3' NCR의 경우 단백질 발현을 조절하는 부분인 것으로 생각할 수 있다. 또한 비보존 부위만을 포함하고 있는 clone에서의 발현은 3' NCR 모두를 deletion 시킨 경우보다는 높은 것으로 (Figure 4. A), 4. B)) 단순히 보존 부위와 ORF 사이의 공간적 역할만을 하는 것은 아닐 것으로 추측된다. 이러한 비보존 부위가 단백질 발현에서 어떤 역할을 담당하는지는 염기서열이나 염기수에 대한 돌연변이 분석 실험을 통해 NCR의 역할에 대한 보다 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

NCR에서 보이는 이런 조절 기작, 특히 3' NCR 부위에 의한 발현 기작이 자신의 유전자 발현 뿐 아니라 이종의 단백질 발현 조절에도 관여하는지를 알아보기 위해 luciferase gene을 포함한 clone을 이용하여 그 역할을 알아보았다. Luciferase clone들을 Vero E6 cell에 transfection 시킨 후 luciferase assay를 실시한 결과 Np clone에서와 마찬가지로 3' NCR이 deletion된 clone에서 luciferase 활성이 감소됨을 확인하였다 (Figure 3. C)). 3' NCR 중에서도 보존 부위를 deletion 시킨 clone은 3' NCR을 모두 포함하고 있는 경우 보다 약 20% 정도 그 활성이 감소하였다 (Figure 4. C)). 이 결과들로 미루어 한탄바이러스의 NCR은 자신의 유전자 뿐만 아니라 이종 유전자 발현도 translation 수준에서 조절하고 있음이 확인되었다.

Non-segmented negative-sense RNA virus인 Paramyxovirus 계통의 3' end 염기서열이 RNA 전사율 (transcription rate)을 결정하는 일차적 결정인자 (primary determinant)임이 보고된 바 [14], 한탄바이러스의 3' NCR도 비슷한 기능을 할 것으로 추측된다. 3' NCR이 전사율도 조절한다면 단백질 발현의 차이는 전사 수준에서 조절을 받아 mRNA의 양적 차이나 RNA 안정성의 차이에 의해 단백질 발현이 차이가 생길 것이라고 생각할 수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서 사용한 clone들을 Vero E6 cell에 DNA transfection 시켜 total RNA를 분리한 뒤 RT-PCR에 의해 각 RNA의 생성 및 그 양을 비교

함으로써, NCR이 transcription에 영향을 미치는지 알아보려고 하였으나 RNA level에서의 양적인 차이는 확인할 수 없었다 (결과 제시 않음). 따라서 한탄바이러스의 S genome의 3' NCR은 전사과정에서 조절작용을 한다기보다는 translation 과정에서 유전자 발현 조절에 관여할 것으로 여겨진다. 그러나 RT-PCR에 의한 실험의 결과는 단순히 RNA의 양만을 비교한 것이므로 이 결과만으로 선불리 전사과정에서의 NCR의 역할을 배제한다는 것은 무리가 있으리라 생각된다. NCR의 보다 정확한 역할을 알아보기 위해서는 RNA 안정성을 비교해 보아야 할 것으로 생각되며 이를 알아보기 위해서는 transfection한 세포에서 RNA를 추출하여 Northern hybridization을 실시하거나 primer extension 등과 같은 추가 실험이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

현재까지 한탄바이러스 유전자 구조 및 역할에 관한 분자생물학적 연구가 많지 않을 뿐만 아니라 바이러스 유전자 조작을 위한 실험 체계가 확립되어 있지 않은 실정이다. 본 연구 결과를 기초로 한탄바이러스의 단백질 발현 조절 기작이 밝혀지게 된다면 바이러스의 유전학적, 생물학적 특성, 바이러스주와 숙주간의 관계, 진화 및 병원성 등 한탄바이러스의 전반적인 특성을 폭 넓게 이해할 수 있으리라 기대되어진다. 그러나 바이러스의 증식환 (multiplication cycle) 전반을 이해함에 있어서 단순히 단백질 발현 조절만을 이해하는 것으로 가능한 일이 아니므로 추후 감염성 바이러스를 만드는데 관여하는 cis-acting elements와 trans-acting proteins에 대한 연구가 병행된다면 그 이해의 폭을 넓히는데 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

#### 감사의 글

본 연구는 국립보건원 조사연구사업의 연구 과제 (Hantaan virus genomic RNA packaging mechanism에 관한 연구)로서 지원받아 수행되었기에 이에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Alexander P, Olli V, Antti V: Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77: 2677-2687, 1996.
- 2) Andrew BL, Craig RP, Brain F, Victoria PP, Gail W: Consequences of Vesicular Stomatitis

- virus. *J Virol* **73**: 4705-4712, 1999.
- 3) **Antic D, Lim BU, Kang CY**: Molecular characterization of the M genomic segment of the Seoul 80-39 virus; nucleotide and amino acid sequence comparisons with other hantaviruses reveal the evolutionary pathway. *Virus Res* **19**: 47-58, 1991.
  - 4) **Cheng JC, Chang MF**: Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol* **73**: 7044-7049, 1999.
  - 5) **Dobbs M, Kang Y**: Hantaan virus messenger RNAs contain non-viral 5' terminal sequence and no poly-A at the 3' terminus. *Abstracts of Ninth International Conference on Negative Strand Viruses*: p. 82. Estoril, Portugal, 1994.
  - 6) **Elliott RM**: Nucleotide sequence analysis of the S RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. *Virology* **173**: 426-436, 1989.
  - 7) **Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B**: Eucaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesized bacteriophage T7 polymerase. *Proc Natl Acad USA* **83**: 8122-8126, 1986.
  - 8) **Garcia-Sastre A, Muster T, Barclay WS, Percy N**: Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. *J Virol* **68**: 6254-6256, 1994.
  - 9) **Gott P, Stohwasser R, Schnitzler P, Darai G, Bautz EKF**: RNA binding of recombinant nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virology* **194**: 332-337, 1993.
  - 10) **Hofacker IL, Fekete M, Flamm C, Huynen MA, Rauscher S, Stolorz PE, Stadler PF**: Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Res* **26**: 3825-3836, 1998.
  - 11) **Iverson LE, Rose JK**: Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* **23**: 477-484, 1982.
  - 12) **Jin H, Elliot RM**: Expression of functional Bunyamwera virus L protein by recombinant vaccinia virus. *J Virol* **65**: 4182-4189, 1991.
  - 13) **Lee HW, Lee PW**: Korean hemorrhagic fever. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Kor J Intern Med* **19**: 371-383, 1976.
  - 14) **Lee KH, Seong BL**: The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens. *J Gen Virol* **79**: 1923-1934, 1998.
  - 15) **Lee YS, Seong BL**: Mutational analysis of influenza B virus RNA transcription in vitro. *J Virol* **70**: 1232-1236, 1996.
  - 16) **Lu M, Wiese M, Roggendorf M**: Selection of genetic variants of the 5' noncoding region of hepatitis C virus occurs only in patients responding to interferon alpha therapy. *J Med Virol* **59**: 146-153, 1999.
  - 17) **McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP**: Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the *Bunyaviridae*. *Lancet* **I**: 765-786, 1982.
  - 18) **Mertz GJ**: Hantavirus infection. *Dis Mon Mar* **44**: 85-138, 1998.
  - 19) **Parrington MA, Lee PW, Kang CY**: Molecular characterization of the Prospect Hill virus M RNA segment: a comparison with the M RNA segments of other hantaviruses. *J Gen Virol* **72**: 1845-1854, 1991.
  - 20) **Parvin JD, Palese P, Honda A**: Promoter analysis of Influenza viral RNA polymerase. *J Virol* **63**: 5142-5152, 1989.
  - 21) **Schmaljohn CS, Arikawa J, Hastly SE**: Conservation of antigenic properties and sequence encoding the envelope proteins of prototype Hantaan virus and two virus isolates from Korean hemorrhagic fever patients. *J Gen Virol* **69**: 1949-1955, 1988.
  - 22) **Schmaljohn CS, Dalrymple JM**: Analysis of Hantaan viruses RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology* **131**: 482-491, 1983.
  - 23) **Stillman EA, Whitt MA**: Transcript initiation and 5'-end modifications are separable events during vesicular stomatitis virus transcription. *J Virol* **73**: 7199-7209, 1999.

- 24) **Welzel TM, Kehm R, Tidona CA, Muranyi W, Darai G:** Stable expression of nucleocapsid proteins of Puumala and Hantaan virus in mammalian cells. *Virus Genes* **17**: 185-198, 1998.
- 25) **Willem L, Mark K:** Amplification, expression and packaging of a foreign gene by Influenza Virus. *Cell* **59**: 1107-1113, 1989.
- 26) **Yanagihara R, Amyx L, Lee PW, Asher DM, Gibbs CJ:** Experimental hantavirus infection in nonhuman primates. *Arch Virol* **101**: 125-130, 1988.
- 27) **Xiao SY, Liang M, Schmaljohn CS:** Molecular and antigenic characterization of HV114, a hantavirus isolated from a patient with hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Gen Virol* **74**: 11657-11659, 1993.
-