

우리나라에서 분리된 풍진바이러스의 염기서열 분석 및 유전자 발현

¹고려대학교 의과대학 미생물학교실, 바이러스병연구소, ²고려대학교 대학원
송진원¹ · 김태환² · 김종현¹ · 박광숙¹ · 이용주¹ · 백락주¹ · 송기준^{1*}

=Abstract=

Sequence Analysis of Rubella Viruses Isolated in Korea and Expression of Rubella Specific Gene

Jin-Won Song¹, Tae Hwan Kim², Jong Hun Kim¹, Kwang Sook Park¹,
Yong-Ju Lee¹, Luck Ju Baek¹ and Ki-Joon Song^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Institute for Viral Diseases,

²Korea University Graduate School, Korea University, Seoul 136-705, Korea

During the recent epidemic period (1995~1996), seven strains of rubella virus were isolated in Korea. To analyze phylogenetic relationship between seven Korean strains and rubella virus strains from other different geographical areas, structural genes (E1, E2 and C) of Korean strains were enzymatically amplified and automatically sequenced. The sequence similarities of the E1, E2 and C genes of the cosmopolitan types were 95.8~98.1%, 92.6~99.2% and 96.4~99.3% based on 1,441, 122 and 139 nucleotides and 96.9~98.5%, 90~100% and 97.8~100% based on 480, 40 and 46 amino acids compared to the sequences of strain RA27/3, respectively. In contrast, the sequence similarities of the E1, E2 and C genes of the Asian types were 91.5~92.1%, 83.6~88.5% and 91.4% based on nucleotides and 96.9~97.7%, 85.5% and 97.8% based on amino acids compared to the sequences of strain RA27/3, respectively. However, immunodominant epitopes of the E1 gene of the cosmopolitan and Asian types were well conserved, and the growth patterns in cell culture and immunofluorescent antibody titers in cross-reaction test showed no differences between two different types. In phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of each gene regions, the cosmopolitan and Asian types formed two distinct phylogenetic lineages. These data showed two distinct genotypes of rubella viruses cocirculated in Korea, but no significant differences in the antigenicity of two different rubella virus strains were found.

Key Words: Rubella, cosmopolitan type, Asian type, Phylogeny

서 론

우리나라에서 1978년부터 시작된 풍진예방접종

이후 학동기 아동에서의 풍진발생은 감소하였으나 사춘기 이후의 청소년층에서 풍진발생이 증가하는 양상이 관찰되어 왔으며 1995~1996년에는 고등학교 남학생들을 중심으로 풍진이 유행하기

접수 : 2000년 3월 20일, 논문게재확정 : 2000년 4월 29일

*책임저자: 송기준, 서울시 성북구 안암동 5가, 고려대학교 의과대학 미생물학교실

전화 : (02) 920-6163, Fax: (02) 923-3645, E-mail: songmicr@kucncx.korea.ac.kr

시작하면서 20세 이후 가입기 여성들과 군인, 초등학생, 중고등학생, 대학생에 이르기까지 전연령층에서 다양하게 풍진이 발생하였다.

풍진바이러스는 *Togaviridae*과의 *Rubivirus*속으로 분류되며, lipid envelope을 갖는 60~70 nm의 구형 바이러스로 [8,13] virion core는 capsid protein인 C protein에 둘러싸인 single-stranded, positive polarity 40S RNA genome을 갖고 있다 [12]. 3개의 바이러스 구조단백은 24S subgenomic mRNA에 의해 5'-C-E2-E1-3' 순으로 부호화되어 있으며 C protein은 인산화된 33 kd 단백질로 virion core 구성성분 중 유일한 단백질이다. Envelope에는 transmembrane glycoprotein인 E1과 E2 두 종류의 조합형으로 구성된 6~8 nm 크기의 spike가 돌출되어 있으며 이중 약 481개의 아미노산으로 구성된 E1은 중간부위가 표면으로 노출되어 있어 병원성 및 항원성에 중요한 epitope을 포함하고 있다 [11,17,18].

풍진바이러스가 1962년 세포배양을 통해 처음 분리동정된 이래 [14,19] 미국 및 영국에서 분리된 Therien주 [4,5], M33주 [2], HPV77주 [20], RA27/3주 [9], Judith주 [16] 등에 대한 염기서열이 지속적으로 보고되어 풍진바이러스에 대한 유전학적 및 분자생물학적 연구가 가속화되었다. 그러나 우리나라에서 풍진바이러스의 분리 및 분자유전학적 연구는 1996년에 처음 보고되었으며 [1] 국내 유행 풍진바이러스주는 백신주들을 포함하는 cosmopolitan type과 이완는 7.0~9.7% 정도의 염기서열상의 차이를 보이는 Asian type의 2가지 유전형으로 구분되었다. 따라서 본 연구에서는 2가지 유전형으로 구분되는 국내 분리주들의 배양양상 및 혈청학적 차이를 조사하고 병원성 및 항원성에 중요한 epitope을 포함하고 있는 풍진바이러스 E1 유전자 및 바이러스 구조단백을 coding 하는 E2, C 유전자 부위의 분석과 발현을 통하여 국내 분리 풍진바이러스주의 유전학적 특성 규명과 현재 사용하고 있는 백신주와의 비교분석을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 풍진바이러스 배양 및 동정

RA27/3주 (ATCC VR1359)를 표준균주로 사용하였으며 국내 분리주로는 1995년 및 1996년 풍진대유행기에 분리된 7주의 분리주 (Anam95, Anam96-1, Anam96-2, Anam96-3, Anam96-4, Anam96-5

및 Anam96-6)를 사용하였다.

바이러스 유전형에 따른 증식양상의 비교실험에는 10^4 PFU/ml로 조정된 각 바이러스 상층액을 사용하였으며 간접형광항체법을 이용하여 표준균주 및 분리주간의 반응양상의 차이를 분석하였다. 항혈청은 표준균주 및 분리주의 배양상층액을 ICR mice에 접종하여 제조하였으며 아래와 같이 간접형광항체법을 시행하였다. 항원 슬라이드를 10분간 고정건조시킨 다음, 인산완충식염수 (pH 7.4)로 2배 계단희석된 혈청을 각 well에 가하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 인산완충식염수로 3회 세척 건조한 후 이차항체인 FITC-conjugated anti-mouse IgG을 슬라이드 각 well에 25 µl 씩을 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 다시 인산완충식염수와 증류수로 세척, 건조 후 형광현미경 (Axioscop, Zeiss, Germany) 하에서 400배의 배율로 특이형광점을 관찰하였다.

2. 풍진바이러스 RNA 추출 및 RT-PCR

세포배양 상층액 150 µl에 Ultraspec™ sol. 850 µl와 chloroform 200 µl를 가하고 15초 동안 vortex로 혼합한 후 4℃에서 5분간 방치하였다. 4℃에서 $12,000 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액에 200 µl isopropanol과 20 µl RNA Tack™ Resin을 첨가하여 30초간 vortex로 혼합하고 1분간 원심분리시켰다. 침전물을 75% ethanol로 2회 씻어 진공건조시킨 후 DEPC-ddH₂O 20 µl로 용출시켜서 -70℃에 보관하였다.

cDNA 합성을 위해 반응액 20 µl에 RNA 8 µl, 0.1 µM primer, 20 unit RNase inhibitor, Superscript II (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 5 unit, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 250 µM dNTPs를 넣고 mineral oil을 첨가한 후 95℃에서 3분간, 40℃에서 50분간 반응시킨 다음 4℃에 보관하였다.

PCR 반응액 50 µl에 cDNA 산물 5 µl, 50 nM 1차 primer 한쌍, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.02 unit DynaZyme (Finnzyme OY, Finland)를 넣고 mineral oil을 첨가한 후 SingleBlock thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)에서 35회 주기로 증폭하였다. 증폭에 사용한 주기는 첫번째 주기는 95℃ 5분, 55℃ 1분 30초, 72℃ 3분이며, 증폭에는 95℃ 1분 30초, 55℃ 1분 30초, 72℃ 2분으로 35회 반복하고, 마지막 주기로는 95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃

Table 1. List of primers used in this study

Name	Sequence
E1 gene	
R1761	5'-GGTAAAAGCCTCCTCGCCATAG-3'
F1789	5'-GCTTTCACCTACCTCTGCAC-3'
F2376	5'-CACCGCAATCAGCAGTCCC-3'
R2187	5'-GTAGCTAGCRAGGGCGAACA-3'
R2606	5'-CCCGGGTCACTTGCGCGCCTGA-GAGCCT-3'
R3225	5'-AGTGGGCTAGTGCGGGTTTC-3'
R3249	5'-ATGCAGCAACAGGTGCGGGAA-3'
E2 gene	
R1322	5'-GGCCCGCACCCAGACAAGAAGC-3'
C gene	
F678	5'-CTACGCCGAGCAGGATTTTC-3'

*The number in the primer name corresponds to the nucleotide numbers of rubella virus structural protein gene.

*Alphabet F and R mean forward and reverse, respectively.

10분을 이용하였다. 본 연구에 사용한 primer들은 Table 1에 표시하였다.

3. 풍진바이러스 염기서열 분석과 deduced 아미노산서열의 분석

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 사용하여 반응액 20 µl당 Terminator Ready Reaction Mix 8 µl, 1 µM primer 3.2 µl와 30~100 ng template을 첨가하고 mineral oil을 가하여 thermal cycler로 25회 주기로 증폭했다. 증폭에 사용한 주기는 96℃ 30초, 50℃ 15초, 60℃ 4분이며 첫번째 주기는 96℃ 5분이었으며 4% polyacrylamide sequencing gel에서 3000 V로 전기영동하고 ABI PRISM™377 DNA Sequencer로 염기서열 결과를 판독하였다.

LaserGene program (DNASTAR, Madison, WI)을 사용하여 풍진바이러스주들의 cDNA 염기서열과 deduced 아미노산서열을 기준에 알려진 백신주 및 외국에서 분리된 바이러스주들의 (Table 2) 염기서열 및 deduced 아미노산서열과 비교분석하고 계통 분석을 시행하였다.

Table 2. Rubella virus strains compared in this study

Strain	Place of origin	Year of isolation
RA27/3	USA	1964
Therien	USA	1964
Judith	UK	1962
Thomas	UK	1966
To-336	Japan	1967
TCRB19	Japan	1967
Matsuura	Japan	1969
A1	Japan	1976
A2	Japan	1977
A3	Japan	1987
A4	Japan	1987
A5	Japan	1990
A6	Japan	1990
IM	Japan	1987
CT	Japan	1987
YT	Japan	1987
HS	Japan	1987
NC	Japan	1990
WK	Japan	1991
SM	Japan	1991
BRD2	China	1980
379	Hong Kong	1980
C3130	Hong Kong	1985
Anam95-1	Korea	1995
Anam96-1	Korea	1996
Anam96-2	Korea	1996
Anam96-3	Korea	1996
Anam96-4	Korea	1996
Anam96-5	Korea	1996
Anam96-6	Korea	1996

4. 풍진바이러스의 유전자 발현

E1 gene sequence에서 1787~3225 위치의 유전자 부위를 각각 EcoRI, NotI 제한효소 인식부위가 있는 1쌍의 primer를 사용하여 증폭한 후, T4 DNA

ligase (Promega, Madison, WI)를 사용하여 pT7 blue T vector (Novagen, Madison, WI)에 연결하고 DH5 α (Promega, Madison, WI) 대장균주에 형질전환시킨 후, EcoRI, NotI 제한효소로 E1 유전자의 삽입을 확인하였다. 이 확인된 colony에서 E1 유전자를 다량으로 얻은 후, 발현 벡터 pGEX-5X-3 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 다시 연결하고, DH5 α 에 형질전환하였다. 정방향으로 삽입이 확인된 재조합 DNA는 발현 숙주인 BL21(DE3)pLysS로 다시 형질전환시키고, IPTG를 최종농도 1 mM이 되도록 첨가하여 3시간 동안 단백질의 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 glutathione-sepharose 4B (Sigma, ST. Louis, MO) affinity column으로 부분정제한 후 10% SDS-PAGE gel에서 발현을 확인하였다. 이 10% SDS-PAGE gel상의 단백질을 Xcell IITM Mini-Cell (Novex, San Diego, CA) transfer module에서 150 mA로 3시간 동안 nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH)에 옮긴 후, 5% skim milk (DIFCO, Detroit, MI)로 밤새 blocking 하였다. Blocking된 NC membrane을 human anti-rubella Ab 1:320 희석용액으로 1시간 동안 반응시킨 후, washing buffer (TBST; 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 3회 씻어준 후, peroxidase labelled anti-human Ab (Sigma, ST. Louis, MO) 1:10000 희석용액으로 30분간 반응시켰다. 반응의 확인은 ECL kit (Amersham, Cleveland, Ohio)을 사용하였으며, 기질인 ECL 용액 1과 2를 동량 섞은 후, NC membrane을 팔고루 적셔서 cassette에 넣어 CP-blue film (AGFA, Belgium)에 적당시간 노출시킨 후, 현상하여 판독하였다.

결 과

1. 풍진바이러스 배양 및 동정

풍진바이러스 증식배양 비교실험에서 10⁴ PFU/ml의 동일한 바이러스 양을 접종하고 동일 조건에서 4일간 배양한 후 관찰한 바이러스 증식정도는 cosmopolitan type에 속하는 RA27/3주와 Anam 96-5주는 각각 2×10⁴ PFU/ml 및 0.9×10⁶ PFU/ml이었으며 Asian type에 속하는 Anam96-1주는 1.2×10⁶ PFU/ml이었다. 따라서 국내 분리주인 Anam 96-1주와 Anam96-5주는 각기 다른 유전형에 속하나 증식정도에 차이를 나타내지 않았던 반면 표준주인 RA27/3주는 같은 유전형의 국내 분리주

에 비해 낮은 증식정도를 나타내었다. 간접형광 항체법을 이용한 바이러스 동정시험에서 국내 분리주들은 유전형에 관계없이 표준주와 비교하여 항체의 차이를 보이지 않았다.

2. 우리나라에서 분리된 풍진바이러스의 염기서열상의 특성

E1 유전자는 coding 부위 전체인 1443 bp를, E2 유전자는 5' 시작부위 122 bp를, C 유전자는 3' 말단부위 140 bp를 분석하였다. 우리나라에 분포하는 풍진바이러스 염기서열의 유형은 각 유전자 부위에 관계없이 cosmopolitan 및 Asian type의 2군으로 구분되었으며 국내 분리주 상호간에는 E1, E2 및 C 유전자 부위에서 91.5~99.6%, 83.6~100% 및 89.2~100%의 상동성을 나타내었다. 우리나라에서 풍진예방백신으로 가장 많이 사용되고 있는 cosmopolitan type의 RA27/3주와 비교시 국내 분리주 중 cosmopolitan type으로 분석된 Anam96-2, Anam96-3, Anam96-5 및 Anam96-6주는 각 유전자 부위에서 95.9~96.3%, 92.6% 및 96.4~97.1%의 상동성을 보인 반면 Asian type으로 분석된 Anam 95-1, Anam96-1 및 Anam96-4주는 각각 91.5~91.7%, 88.5~87.7% 및 91.4%의 상대적으로 낮은 상동성을 나타내었다. 국내 분리주에서 관찰되는 변이는 대부분이 transition이었고 codon 위치상에서 세번째의 변이가 주로 발생하였으며 deletion이나 insertion 등의 frame-shift 변이는 관찰되지 않았다. Asian type과 cosmopolitan type간에 차이를 보이는 특이한 변이들은 각 유전자 부위에서 23개, 11개 및 10개가 관찰되었으며 동일한 Asian type과 cosmopolitan type 내에서도 국내 분리주와 외국 분리주간에 차이를 보이는 변이가 Asian type간에는 분석 가능하였던 E1 유전자 부위에서 13개가, cosmopolitan type간에는 각 유전자 부위에서 각각 4개씩이 관찰되었다. Asian type 및 cosmopolitan type의 구분에 관계없이 국내 분리주에서만 관찰되는 고유한 변이가 E1 및 C 유전자 부위에서 각각 1개씩 특이하게 관찰되었다.

3. 우리나라에서 분리된 풍진바이러스의 아미노산서열상의 특성

우리나라에서 분리된 풍진바이러스 E1, E2 및 C 유전자의 염기서열을 토대로 deduced 아미노산서열을 분석하였다. E1 단백질은 전부를 포함하는 481 amino acid를, E2 단백질은 amino-terminal 부위 40

amino acid를, C 유전자는 carboxy-terminal 부위 45 amino acid를 분석정렬하였다 (Figure 1). 우리나라에 분포하는 풍진바이러스 아미노산서열의 유형

은 E1 및 E2 외피단백의 경우에는 Asian type 및 cosmopolitan type의 구분이 가능하였으나 capsid 단백질인 C 단백질의 경우에는 의미있는 차이가 관찰되

A

Majority	EEAFTYLCTAPGCATQTPVPVRLAGVRFESKIVDGGCFAPMDLEATGACICEPTDVSCEGLGAWVPTAPCARINNGTQRACTFVAVNAYSSSGGYQLASYFNPGGSYYKQYHPTACEVPE	
RA27/3(USA)A.....Q. 361
Therien(USA)A..... 361
HPV77(UK)G.....A..... 361
Thomas(UK)A..... 361
A1M..... 361
A2D..... 361
A3D..... 361
A4 361
A5A.....V..... 361
A6A.....V..... 361
CT 361
HS 361
IM 361
MatsubaA..... 361
Matsuura 361
NCS..... 361
SM 361
TakahashiA..... 361
TCRB19A..... 361
To366 361
WK 361
YT 361
Ana96-2 361
Ana96-3,5,6 361
c3130(HK) 361
379(HK)A.....D..... 361
BRD2(China)A.....D..... 361
Ana96-1(Asian)F.....A.....D..... 361
Ana96-4,95(Asian)F.....A.....D..... 361
Majority	AFGHSDAACWGFPTDTVMSVFALASYVQHPKTVRVKFKHTETRTVMQLSVAGVSCNVTTEHPFCNTPHGQLEVPDPDGLVEYINNYTGNGQSRWGLGSPNCHGPDWASPVQQRHSPDC	
RA27/3(USA)L.....H..... 724
Therien(USA) 724
HPV77(UK) 724
Thomas(UK)A..... 724
A1 724
A2 724
A3 724
A4 724
A5 724
A6 724
CT 724
HS 724
IM 724
MatsubaO.....M..... 724
MatsuuraA.....D.....S..... 724
NCL..... 724
SM 724
TakahashiD.....M..... 724
TCRB19 724
To366A..... 724
WKT.....D..... 724
YT 724
Ana96-2A..... 724
Ana96-3,5,6 724
c3130(HK)A.....S.....F..... 724
379(HK)N.....F..... 724
BRD2(China)N.....D.....W.....F..... 724
Ana96-1(Asian) 724
Ana96-4,95(Asian) 724
Majority	SRLVGATPERPRLRLVDADDPLRLTAPGPGVEVWVTPVIGSQARKCGLHTRAGPYGHATVEMPEWIHAHTTSDPHPPGLGLKFKTVRPVALPRALAPPNVRVTGCYCGTALVEGLAP	
RA27/3(USA)V.....S.....R..... 1087
Therien(USA) 1087
HPV77(UK)T..... 1087
Thomas(UK)R..... 1087
A1W..... 1087
A2 1087
A3 1087
A4 1087
A5 1087
A6 1087
CT 1087
HSW.....A..... 1087
IM 1087
Matsuba 1087
MatsuuraT..... 1087
NCW.....A.....V..... 1087
SM 1087
TakahashiV.....T..... 1087
TCRB19M..... 1087
To366R..... 1087
WKV.....R.....Y..... 1087
YTV.....V..... 1087
Ana96-2R.....V.....V..... 1087
Ana96-3,5,6 1087
c3130(HK)E.....V..... 1087
379(HK)H..... 1087
BRD2(China) 1087
Ana96-1(Asian)V.....E.....E..... 1087
Ana96-4,95(Asian)V.....E.....E..... 1087

Figure 1.

송진원 등: 풍진바이러스 분자유전학적 분석

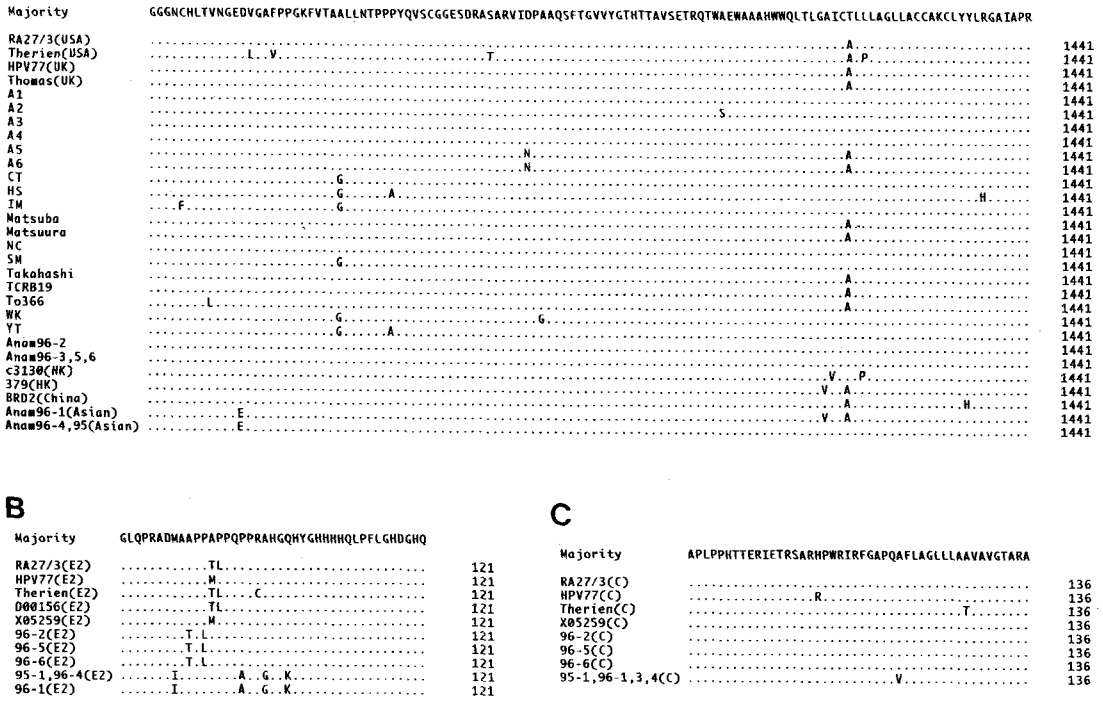


Figure 1. Amino acid sequence alignments of E1 (A), E2 (B), and C (C) genes of rubella viruses from the different geographical areas

지 않았다. 아미노산서열상에서 국내 분리주 상호간의 E1, E2 및 C 단백질 부위의 상동성은 97.9~99.8%, 85.0~100% 및 97.8~100%이었으며, 표준주인 RA27/3주와 비교시 국내 분리주 중 cosmopolitan type주는 각 단백질 부위에서 97.9~98.1%, 90.0% 및 100%의 상동성을 보인 반면 Asian type주는 각각 96.9%, 85.0% 및 97.8%의 상동성을 나타내었다. Asian type과 cosmopolitan type간에 차이를 보이는 특이한 변이들은 각 단백질 부위에서 1개, 4개 및 1개가 관찰되었으며 동일한 Asian type과 cosmopolitan type 내에서도 국내 분리주와 외국 분리주간에 차이를 보이는 변이가 Asian type간에는 분석 가능하였던 E1 단백질 부위에서 5개가, cosmopolitan type간에는 E1 및 E2 단백질에서는 1개 및 2개가 관찰된 반면 C 단백질 부위에서는 이러한 변이가 관찰되지 않았다.

항원성에 중요한 E1 단백질의 아미노산서열 중 4개의 규명된 epitope 부위는 Asian type과 cosmopolitan type의 구분없이 모두 잘 보존되어 있었으며 E1 단백질의 3차원 구조분석에서도 alpha-helix와 beta-sheet의 미세한 변화만이 관찰되었으며 전반적인 항원성이나 친수성 등 단백질 구조 및 특성

에 영향을 주는 중요한 변화는 관찰되지 않았다 (data not shown).

4. 풍진바이러스의 계통분석

풍진바이러스 E1, E2 및 C 유전자의 염기서열을 토대로 계통분석을 시행한 결과 (Figure 2) 1995~1996년에 우리나라에서 유행한 풍진바이러스는 Asian type과 cosmopolitan type의 두 계통군으로 명확하게 구분되었다. 이와 같이 동일한 지역 내에서 두 종류의 풍진바이러스가 공존하는 양상은 홍콩지역에서 분리된 두 풍진바이러스주에서도 관찰되었으며 이 홍콩 분리주들은 국내 분리주와 계통분석상에서 가장 밀접한 연관성을 나타내었다. E1, E2 및 C 단백질의 아미노산서열을 토대로 시행한 계통분석에서는 E2 단백질에서만 Asian type과 cosmopolitan type 두 계통군의 구분이 관찰되었으며 E1 및 C 단백질에서는 Asian type과 cosmopolitan type이 혼재하는 양상으로 분포하였다.

5. 풍진바이러스 E1 유전자의 발현

풍진바이러스 계통분석에서 Asian type에 속하는 국내 풍진바이러스의 E1 부위를 GST fusion 단

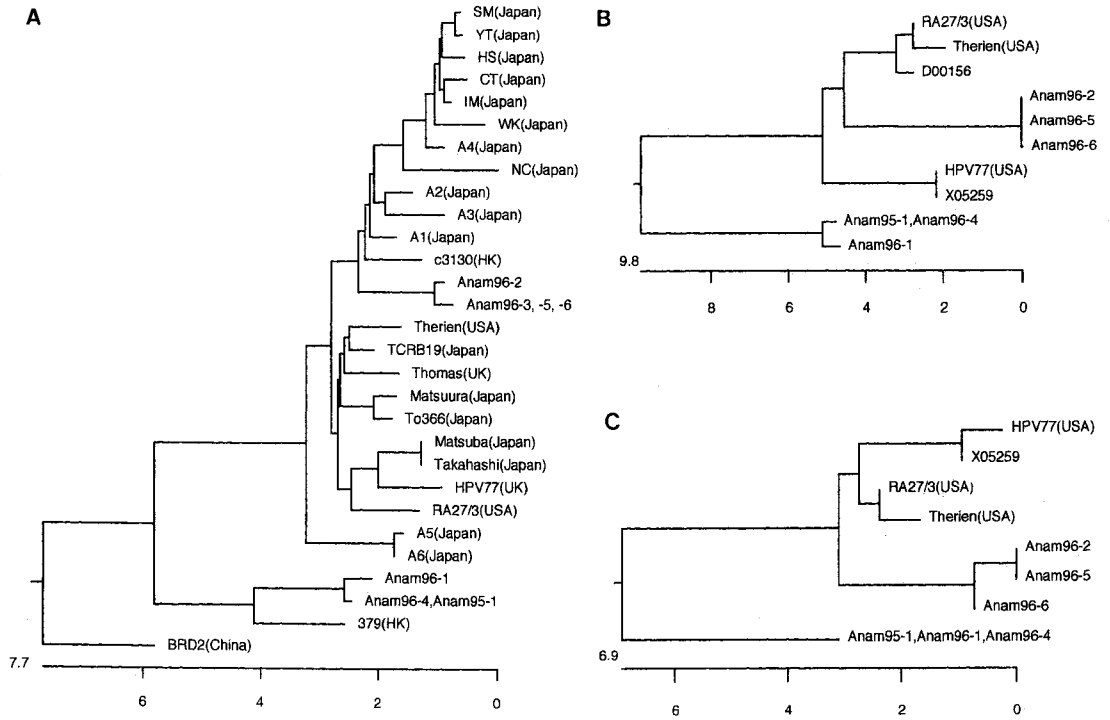


Figure 2. Phylogenetic trees based on E1 (A), E2 (B), and C (C) gene nucleotide sequences

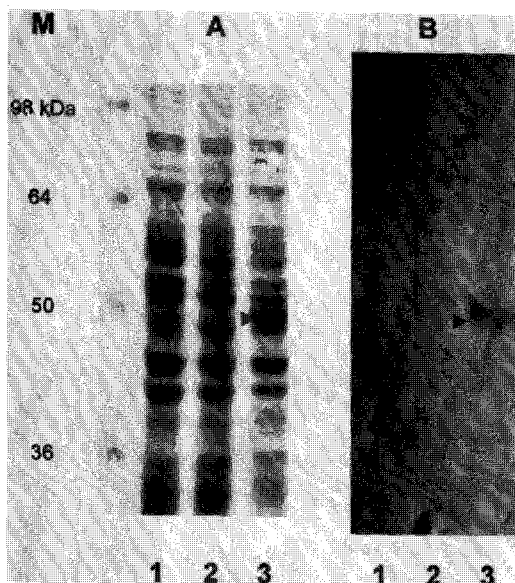


Figure 3. Analysis of prokaryotically expressed partial E1 protein. Lysates either before (lane 2) or after (lane 3) induction with IPTG were fractionated Coomassie blue (Panel A) and transferred to nitrocellulose, reacted with goat anti-rubella serum (Panel B). M: molecular weight marker, lane 1: negative control (vector only)

백질 발현 벡터 pGEX5X-3에 cloning 하였고, 숙주 BL21(DE3)pLysS에서 GST-E1 fusion 단백질을 발현시켰다. 발현 단백질을 GST-affinity chromatography로 정제하여 SDS-PAGE상에서 단백질의 정제도와 예상되는 81 kDa의 분자량을 확인하였으며 발현 단백질의 antigen으로서의 생물학적 기능을 확인함에 있어서 western blotting을 시행한 결과 anti-rubella Ab와 특이적으로 반응함을 확인하였다 (Figure 3).

고 찰

풍진바이러스는 세포배양에 의해 1962년에 처음 분리되었으며 이후 주로 미국, 영국, 일본에서 풍진바이러스의 염기서열에 대한 보고가 집중되었고 최근에서야 일본을 제외한 아시아지역의 풍진바이러스 염기서열에 대한 연구 결과가 발표되어 풍진바이러스의 두 유전형이 알려지게 되었다 [3,7]. 우리나라에서 분리된 풍진바이러스 중 cosmopolitan type에 속하는 풍진바이러스주들은 미국이나 영국에서 분리된 풍진바이러스주들 보다는 일본 및 홍콩에서 분리된 cosmopolitan type

과 보다 밀접한 연관성을 보이고 있다. 이러한 지역분포에 따른 풍진바이러스주들의 특성은 다른 연구 결과에서도 나타나고 있으며 1969년도 이후 풍진예방백신의 보급 이후에 더욱 뚜렷하게 관찰되는 특성을 보이고 있다. 즉 유럽 및 일본에서 1960년대에 분리된 풍진바이러스주들과 그 이후에 분리된 풍진바이러스주들은 지역별로 각기 다른 계통군으로 분리되며 1970년대 이후 분리된 풍진바이러스주들에서도 1970년대와 1990년대에 분리된 풍진바이러스주들은 지역에 따라 각기 다른 계통군으로 나누어지는 특성을 보인다. 우리나라에서는 1995년에서야 풍진바이러스의 분리가 이루어져 연도에 따른 변화는 알 수 없으나 cosmopolitan type의 경우 가까운 일본과 비교시 1960년대에 분리된 풍진바이러스주들 보다는 1980년대 및 1990년대에 분리된 풍진바이러스주들과 보다 밀접한 연관성이 관찰된다.

최근 1995~1996년 풍진 대유행시에 풍진바이러스 변이주 감염에 의한 풍진 대유행의 가능성이 제기된 바 있었으나 풍진바이러스 변이주는 발견되지 않았다. 각기 계통학적으로 차이를 보이는 두 군의 풍진바이러스가 동시에 유행한 사실이 규명되기는 하였으나 본 연구 결과에서 확인된 바와 같이 혈청형이 다른 풍진바이러스는 분리되지 않았다. 항원성에 중요한 E1 유전자의 염기서열 분석에서 Asian type과 cosmopolitan type 간에 약 8%의 변이율이 관찰되었으나 아미노산 서열상에서는 약 2% 내외의 차이만이 관찰되었고, 면역학적으로 중요한 epitope들이 잘 보존되어 있었으며, E1 단백질의 3차원 구조분석에서도 의미 있는 차이는 발견되지 않았다. 바이러스 배양실험에서 두 군간에 배양특성에 차이가 없었으며 형광항체검사에서도 항체가의 차이를 발견할 수 없었던 점도 두 군간에 항원성에 별 차이가 없음을 증명하고 있다. 특히 Katow 등이 [7] Asian type에 속하는 중국 분리주인 BDR2주를 이용한 중화항체검사에서 cosmopolitan type에 속하는 분리주들과 비교시 중화항체가에 차이를 발견하지 못한 점과 본 연구에서 발현한 Asian type E1 gene 산물이 cosmopolitan type에 속하는 표준균주 및 국내 분리주를 이용한 항혈청과의 반응성이 동일균주를 이용한 항혈청과의 반응성과 차이를 나타내지 않은 결과는 풍진바이러스의 변이정도가 아직까지는 새로운 변이주의 출현에까지는 이르지 못하고 있음을 보여주고 있다고 하겠다.

풍진바이러스의 염기서열분석은 주로 E1 유전자 부위에 집중되어 있으며 상대적으로 E2 및 C 유전자 부위에 대한 유전정보는 매우 한정되어 있다. 풍진바이러스는 약 10 kbp의 염기로 구성되어 있으며 특이하게 guanine과 cytosine이 차지하는 G+C content가 70%에 달한다. 따라서 풍진바이러스의 유전자 분석은 매우 어려우며 초기에 시행된 염기서열 분석 결과는 동일한 바이러스주를 사용하였음에도 불구하고 일치하지 않는 경우가 있었다. 본 연구에서도 E2 및 C 유전자 부위의 분석에는 많은 문제점들이 있었다. 증폭 뿐만 아니라 증폭된 산물의 염기서열 결정에 이르기까지 높은 G+C content에 따른 여러 어려운 점으로 인해 C와 E2 유전자의 경계부위 258 bp의 염기서열 분석만이 가능하였다. E2 단백질은 풍진바이러스의 strain-specific 항원을 지니고 있는 것으로 알려져 있으며 본 연구에서도 가장 높은 변이율을 나타내었으며 아미노산서열을 토대로한 계통수에서도 유일하게 두 유전형이 각기 다른 계통군을 형성하였다. 일반적인 바이러스들에서도 그 항원성이 잘 보존되어 있는 C 단백질의 경우에는 본 연구에서도 가장 낮은 변이율을 나타내었으며 따라서 풍진바이러스의 변이율은 E2, E1, C 유전자 부위 순으로 분석되었다.

RNA 바이러스는 그 유전학적 특성상 높은 변이율을 보이며 더욱이 백신접종사업에 따른 natural selection에 의해 그 변이속도가 더욱 증가되므로 변이주의 출현 가능성이 다른 DNA 바이러스에 비해 매우 높은 편이다. 따라서 우리나라에서 유행하는 풍진바이러스에 대한 지속적인 유전정보의 확보는 예방백신의 개선 및 백신접종사업의 계획수립 및 성과에 매우 유용한 정보로 활용 가치가 높다고 하겠다.

감사의 글

이 논문은 (1997, 1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

- 1) 송기준, 백락주, 정재희, 강주일, 박광숙, 김세연, 송진원, 김민자, 김우주, 정희진, 이용주: 1995년 및 1996년에 국내에서 분리된 풍진바이러스의 염기서열 및 계통분석. *Korean J Infect Dis* 29: 191-200, 1997.
- 2) Clarke DM, Loo TW, Hui I, Chong P, Gillam

- S:** Nucleotide sequence and in vitro expression of rubella virus 24S subgenomic messenger RNA encoding the structural proteins E1, E2 and C. *Nucl Acids Res* **15**: 3041-3057, 1987.
- 3) **Frey TK, Abernathy ES, Bosma TJ, Starkey WG, Corbett KM, Best JM, Katow S, Weaver SC:** Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961~1997. *J Infect Dis* **178**: 642-650, 1998.
 - 4) **Frey TK, Marr LD, Hemphill ML, Dominguez G:** Molecular cloning and sequencing of the region of rubella virus genome coding for glycoprotein E1. *Virology* **154**: 228-232, 1986.
 - 5) **Frey TK, Marr LD:** Sequence of the region coding for viron proteins C and E2 and the carboxy terminus of the nonstructural proteins of rubella virus: comparison with alphaviruses. *Gene* **62**: 85-99, 1988.
 - 6) **Hemphill ML, Forng R-Y, Abernathy ES, Frey TK:** Time course of virus-specific macromolecular synthesis during rubella virus infection in Vero cells. *Virology* **162**: 65-75, 1988.
 - 7) **Katow S, Minahara H, Fukushima M, Yamaguchi Y:** Molecular epidemiology of rubella by nucleotide sequences of rubella virus E1 gene in three East Asian countries. *J Infect Dis* **176**: 602-616, 1997.
 - 8) **Murphy FA, Halonen PE, Harrison AK:** Electronmicroscopy of the development of rubella virus. *J Virol* **2**: 1223-1227, 1968.
 - 9) **Nakhasi HL, Thomas D, Zheng DX, Liu T-Y:** Nucleotide sequence of capsid, E2 and E1 protein genes of rubella virus vaccine strain RA 27/3. *Nucl Acids Res* **17**: 4393-4394, 1989.
 - 10) **Nawa M:** Focus formation by rubella virus and rabbit kidney (RK-13) cell culture and its application to the virus titration. *Arch Virol* **60**: 75-78, 1979.
 - 11) **Oker-Blom C, Kalkkinen N, Kaariainen L, Pettersson RF:** Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E1, E2a and E2b. *J Virol* **46**: 964-973, 1983.
 - 12) **Oker-Blom C, Ulmanen I, Kaariainen L, Pettersson RF:** Rubella virus 40S genome RNA specifies a 24S subgenomic mRNA that codes for a precursor to structural proteins. *J Virol* **49**: 403-408, 1984.
 - 13) **Oshiro LS, Schmidt NJ, Lennette EH:** Electronmicroscopic studies of rubella virus. *J Gen Virol* **5**: 205-210, 1969.
 - 14) **Parkman PD, Buescher EC, Artenstein MS:** Recovery of rubella virus from army recruits. *Proc Soc Exp Biol Med* **111**: 225, 1962.
 - 15) **Parkman PD:** Biological characteristics of rubella virus. *Arch Ges Virusforsch* **16**: 401-411, 1965.
 - 16) **Terry GM, Ho-Terry L, Londesborough P, Pees KR:** Localization of the rubella E1 epitopes. *Arch Virol* **98**: 189-197, 1988.
 - 17) **Trudel M, Ravaoarino M, Payment P:** Reconstitution of rubella hemagglutinin on liposomes. *Can J Microbiol* **26**: 899-904, 1980.
 - 18) **Waxham MN, Wolinsky JS:** A model of the structural organization of rubella virions. *Rev Infect Dis* **7**: S133-S139, 1985.
 - 19) **Weller TH, Neva FA:** Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **111**: 215-225, 1962.
 - 20) **Zheng DX, Dickens L, Liu T-Y, Nakhasi HL:** Nucleotide sequence of the 24S subgenomic messenger RNA of vaccine strain (HPV77) of rubella virus: comparison with a wild-type strain (M33). *Gene* **82**: 343-349, 1989.