

한국에서 분리된 콕사키 바이러스 B3 cDNA의 클로닝 및 전체 염기서열 분석

¹중앙대학교 자연과학대학 생명과학과, ²국립보건원 바이러스질환부 소화기계바이러스과

정운석^{1,2} · 김기순^{1,2} · 박정구² · 이윤성¹ · 신수연¹ · 천두성² · 지영미²
김문보¹ · 나병국¹ · 윤재득² · 이광호¹ · 송철용^{1*}

=Abstract=

Cloning and Sequence Analysis of the Full-length cDNA of Coxsackievirus B3 Isolated in Korea

Yoon Seok Chung^{1,2}, Ki Soon Kim^{1,2}, Jeong Koo Park², Yoon Sung Lee¹,
Soo Youn Shin¹, Doo Seong Cheon², Youngmee Jee², Moon Bo Kim¹,
Byoung Kuk Na¹, Jae Deuk Yoon², Kwang-Ho Lee¹
and Chul Yong Song^{1*}

¹Department of Life Science, College of Natural Science, Chung-Ang University,

²Laboratory of Enteroviruses, Department of Virology, National Institute of Health

We have determined and analyzed the full-length cDNA sequence of a coxsackievirus B3 (CVB3) Korean isolate (CVB3-Korea/97) which has been known as a general human pathogen. The whole genome contains 7,400 nucleotides and has a single large open reading frame with 6,555 nucleotides that encodes a potential polyprotein precursor of 2,185 amino acids. The genome also contains a 5' non-coding region (NCR) of 741 bases and a 3' NCR of 104 bases followed by poly(A) tail. Sequence homologies of nucleotides and deduced amino acids between the CVB3-Korea/97 strain and the prototype (Nancy strain) were 81.7% and 91.5%, respectively. The genes encoding the functional proteins including viral protease and RNA dependent RNA polymerase showed higher homology than those encoding the structural proteins. We have further analyzed the sequences of 5' NCR, VP1 and VP2 of CVB3-Korea/97, which are known as cardiovirulent determining factors at the nucleotide and amino acid levels. Although the CVB3-Korea/97 strain was isolated from an aseptic meningitis patient without cardiomyopathy, its 234th nucleotide and 165th amino acid were uracil and Asn as same as those of other cardiovirulent strains one. However, the 155th amino acid of VP1, which closely associated with cardiovirulence, was replaced with Arg¹⁵⁵ by single nucleotide substitution from A²⁹¹⁶ to T²⁹¹⁶. Moreover, additional amino acid substitutions were observed in the flanking region of Asp¹⁵⁵. Taken together, amino acid(s) substitution in VP1 may play a critical role in determining cardiovirulence of the CVB3-Korea/97 strain rather than individual nucleotide replacements in the 5' NCR and/or an amino acid substitution in VP2.

Key Words: Coxsackievirus B3, CVB3-Korea/97, Sequence analysis, Cardiovirulence

접수 : 2000년 3월 27일, 논문게재확정 : 2000년 4월 29일

Corresponding author: Chul Yong Song, Ph.D. Department of Life Science, College of Natural Science, Chung-Ang University, Heuksuk-dong 221, Dongjak-ku, Seoul 156-756, Korea Phone: 82-2-820-5208, Fax: 82-2-816-6317, E-mail: cysong@cau.ac.kr

서 론

Coxsackievirus B3 (CVB3)는 분류학상 *Picornaviridae*과 *Enteroviruses*속에 속하고, 크기는 약 30 nm이며 7.4 kb의 단일 사슬 (+)-stranded RNA를 포함하는 외피 비보유 (non-enveloped) 바이러스이다. CVB3는 신생아 및 영유아에서 무균성 뇌막염을 비롯한 각종 질병을 유발하며 성인에서는 심근염 (myocarditis) 및 확장성 심근증 (dilated cardiomyopathy)의 주요한 병원체로 보고되어 있다. 특히 심장근육질환의 약 20~30% 정도가 CVB3와 관련이 있는 것으로 알려져 있으나 아직까지 정확한 발병기전은 밝혀져 있지 않다 [2, 10, 19, 23, 24]. 일반적으로 CVB3는 심장근육질환을 일으키는 병원성 바이러스와 심장질환과 무관한 비병원성 바이러스로 구분되며 최근 여러 연구자들은 병원성과 비병원성 바이러스를 비교하여 심장질환 유발기전을 규명하기 위해 유전자 수준의 연구를 진행하고 있다 [6, 15, 26].

많은 연구자들은 Picornavirus의 5' 말단 비암호화 부위 (noncoding region; NCR)가 바이러스 전체 게놈의 해독 및 복제에서 매우 중요한 역할을 담당하는 부분이며, CVB3와 같이 *Picornaviridae*에 속하는 폴리오 바이러스의 경우 병원성을 나타내는 부분이 5' NCR내에 존재한다고 보고된 바 있다 [9, 26]. 특히 Tu 등 [26]은 병원성 및 비병원성 CVB3의 바이러스 5' NCR의 염기서열을 비교한 결과, 병원성 바이러스의 경우 234번째의 염기가 cytosine(C)에서 uracil(U)로 전환된 사실을 관찰하였으며, 이 부분이 병원성을 결정하는 주요요인임을 보고하였다. 그러나 최근 들어 다양한 CVB3 분리주의 염기서열이 밝혀지면서 234번 염기가 U임에도 불구하고 병원성을 나타내지 않는 경우가 보고되는 등 5' NCR의 234번 염기가 CVB3의 병원성을 결정하는 중요한 요인이 아닐 가능성이 높다는 연구 결과도 발표되었다 [6]. 또한 5' NCR에는 Internal Ribosome Entry Site (IRES)가 존재하며 2차 구조가 밝혀짐에 따라 CVB3에서도 병원성 결정과 5' NCR내의 IRES 구조와의 관계가 밝혀질 가능성이 높아지고 있다 [4, 6, 12, 21, 26].

바이러스의 구조를 결정하는 VP1과 VP2는 감수성 세포의 수용체와 결합하게 되며, 바이러스의 감염시 바이러스 부착 (attachment)이나 주입 (entry)과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [7, 13,

14]. CVB3의 경우 VP2의 151번 아미노산이 Thr에서 Ser으로 전환되면 바이러스 외막단백질 (capsid)의 구조적 변화가 유발되어 바이러스와 숙주 세포 수용체의 반응효과를 변화시킨다는 사실이 보고되었다 [3]. 이상과 같이 CVB3 바이러스의 염기서열 변화에 따라 RNA 구조가 변화되고 바이러스 단백질의 구조적 변화가 유발되면, 바이러스의 숙주 세포 선택성 및 숙주 세포 내에서 복제효율에 대한 변화가 야기됨으로써 병원성의 차이를 나타낼 가능성이 있다고 생각한다.

숙주 세포의 수용체와 결합하는 부위와 혈청형으로 분류되는 항원결정기 (epitope) 부위의 단백질을 암호화하는 유전자의 돌연변이로 인하여 새로운 특성을 나타내는 바이러스가 출현할 가능성이 있는데 [18, 20], 실제로 CVB5의 돌연변이로부터 유래된 swine vesicular disease virus (SVDV)의 경우와 같이 유전자 돌연변이에 의해 새로운 변종의 바이러스가 출현될 수 있다는 사실은 여러 연구자들에 의해 이미 확인된 바 있다 [27]. 이와 같이 변이율이 높은 RNA 바이러스인 장내바이러스의 경우도 많은 변종이 출현할 가능성은 매우 높다고 할 수 있으며, 이들의 감염능력이나 질병 유발기전을 밝히기 위해서는 전체 게놈에 대한 염기서열 분석이 매우 중요하다고 할 수 있다.

현재까지 CVB3의 전체 염기서열은 세계적으로 모두 5개 주에 대하여 밝혀진 바 있으며, 그 중 4개 주는 심장질환을 일으키는 병원성 주이며, 나머지 하나는 비병원성인 것으로 알려져 있다 [7, 13, 14, 17, 25]. 국내의 경우 CVB3를 포함한 장내바이러스의 연구는 1990년대 초반부터 이루어지고 있으나 심근염, 확장성 심근증 등 심장질환을 유발하는 CVB3의 분리 및 무균성 뇌막염 환자로부터 분리, 동정된 CVB3에서도 전체 염기서열은 보고된 바 없다. 특히 보고된 CVB3와 국내 분리 CVB3 분리주들과의 염기서열 변이 분석이나 심장질환 또는 무균성 뇌막염을 유발하는 분리주들의 병원성과 관련된 염기서열의 분석은 전혀 시도된 바 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 무균성 뇌막염 환자에서 분리된 CVB3의 전체 게놈을 대상으로 염기서열을 분석한 후 원형주 (Nancy strain) 및 국외의 CVB3 염기서열과 비교하였으며, 국내 분리주의 심장질환의 병인과 관련된 유전자 변이를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 분리 및 동정

환자의 분변 가검물을 PBS (pH 7.2)로 10% 용액이 되도록 섞은 후 원심분리를 실시하여 상층액을 chloroform으로 처리하였다. 처리된 가검물 용액을 rhabdomyosarcoma (Rd-cdc)와 human larynx carcinoma (Hep2-c) 세포에 접종하여 70~80% 정도의 세포병변효과 (cytopathic effect; CPE)가 관찰되면 세포를 -70℃에서 냉동시키고 다시 녹이는 과정을 2~3회 반복한 후 현탁액을 동일 세포에 접종함으로써 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스는 네덜란드 RIVM (Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene, Amsterdam, The Netherlands)에서 제작하여 세계보건기구가 분양한 enterovirus serum pool set 및 CVB에 대한 토끼 다클론 항혈청 (Denka-Seiken)을 사용하여 김 등 [1]의 방법으로 동정하였다. 동정에 사용한 바이러스는 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml의 역가로 희석하여 사용하였다. CVB3에 대한 토끼 다클론 항혈청과 중화가 확인된 바이러스를 CVB3-Korea/97라 명명하였으며 plaque assay를 수행하여 바이러스를 정제 한 후 RNA 추출에 사용하였다.

2. 바이러스 RNA 추출

바이러스 배양 상층액 100 µl에 Tri-reagent LS (Molecular Research Center Inc.)를 300 µl 첨가하여 상온에서 15분간 방치한 후 chloroform를 80 µl 첨가하고 완전히 혼합하여 다시 상온에서 10분간 방치 후 4℃에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리한 다음 무색의 수층을 분리하여 새로운 튜브에 옮기고, 동량의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 방치하였다. 이를 다시 4℃에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 침전물을 70% 에탄올로 세척하여 건조시켰다. 침전물은 10 µl의 0.01% diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma)로 처리된 증류수로 현탁시켜 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다.

3. cDNA 합성

바이러스로부터 추출한 RNA 5 µl에 2.5 mM dNTP 5 µl, 5 × RTase 완충용액 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL) 1 µl, 20 mM oligo-dT 1 µl를 첨가하고 증류수로 20 µl

를 적정한 후 46℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 위와 같이 합성된 cDNA를 PCR의 시료로 사용하였다.

4. Long Distance (LD)-PCR

CVB3 게놈을 기초로 하여 5' 말단 26개의 뉴클레오타이드를 forward primer (ELDF, 5' ttaaaacagcctgtgggtgatcca 3')로 제작하였고, 3' 말단 NCR의 22개 뉴클레오타이드와 oligo-dT가 포함된 40개의 뉴클레오타이드를 제작하여 reverse primer (ELDR, 5' ttttttttttttttttcgaccggaatgcggagaattt 3')로 이용하였다 [11, 15, 16]. PCR 용액은 증류수를 첨가하여 적정한 총 50 µl 내에 dNTP (2.5 mM) 6 µl, 10 × EX Taq (Takara) 완충용액 5 µl, ELDF (10 pmol)와 ELDR (10 pmol) 각각 5 µl, EX Taq 0.5 µl, 합성된 cDNA 3 µl가 포함되도록 하였으며 94℃에서 3분 동안 denaturation시킨 후 94℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 6분 30초의 cycle을 30회 반복하고 마지막으로 72℃에서 7분간 extension하여 CVB3 cDNA의 증폭을 시도하였다. PCR 증폭에 의해 생성된 DNA 산물은 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide (Sigma)로 염색하였다.

5. CVB3-Korea/97 전체 게놈 cDNA의 클로닝

LD-PCR을 통해 증폭된 DNA 산물을 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 CVB3 전체 게놈 크기인 7.4 kb 부근의 band만을 선택하여 분리하였다. 정제한 PCR 산물 4 µl과 pCR2.1 벡터 (Invitrogen) 1 µl를 혼합하여 5분간 정치시켰다가 competent *E. coli* cell Top10F과 함께 ampicillin이 포함된 LB 평판배지에 도말한 후 14~16시간 정도 37℃ 배양기에서 배양하였다. 생성된 집락을 ampicillin이 포함된 LB broth에 진탕배양한 후 plasmid DNA를 추출하여 insert를 확인하였다. Insert가 확인된 plasmid DNA를 EcoRI으로 절단하여 pCR2.2 (modified pCR2.1) 벡터에 subcloning 하였다.

6. 염기서열 분석

클로닝된 plasmid DNA를 주형으로 사용하여 M13 forward와 M13 reverse primer 및 internal primer를 제작한 후 sequencing 하였다 (Table 1). ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer)을 사용하여 생성한 반응 산물을 ABI PRISM 377 DNA sequencer (Perkin Elmer)를 이용하여 조사하였다. 염기서열의 분석

은 Lasergene 프로그램 (DNASTAR Inc.)을 이용하여 실시하였으며, 그 결과를 염기서열이 보고된 기존의 5가지 CVB3 분리주의 염기서열과 비교 분석하였다.

결 과

1. 바이러스의 분리 및 동정

무균성 뇌막염 환자의 가검물은 전처리과정을 거쳐 Rd-cdc 세포와 Hep2-c 세포에 접종하였다. 수일 후 CPE가 관찰된 세포의 배양 상층액을 -70℃에서 얼리고 녹이는 과정을 반복하여 동일 세포에 접종함으로써 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스를 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml의 역가로 희석하여 coxsackievirus B군 동정용 토끼 다클론 항혈청 (Denka-seiken)으로 동정하였다. 혈청형이 CVB3로 동정된 바이러스로부터 Tri-reagent 방법을 이용하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. cDNA가 장내바이러스의 유전자로부터 합성된 것임을 확인하기 위하여 Zoll 등 [28]이 고안한 장내바이러스 특이 primer (EntF, 5' caagcacttctgt-

ttccccgg 3'; EntR, 5' attgtcaccataagcagcca 3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 436 bp 크기의 특이 산물이 증폭되었으며, 이를 통하여 분리한 바이러스가 장내바이러스라는 사실과 cDNA 합성 여부를 확인하였다 (Figure 1).

2. LD-PCR을 이용한 CVB3-Korea/97 전체 게놈의 증폭

중화항체 시험법과 장내바이러스 특이적 PCR 방법으로 확인된 CVB3-Korea/97 cDNA를 주형으로 ELDF, ELDR primer를 이용하여 LD-PCR을 수

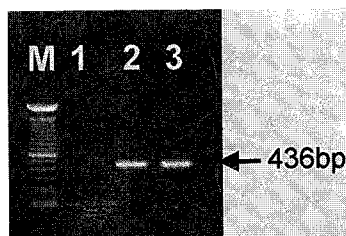


Figure 1. Gel electrophoresis of enterovirus-specific PCR products for the confirmation of cDNA synthesis. An arrow indicates amplified PCR products of 436 bp in size. M, 100 bp ladder; lane 1, negative control (D.W.); lane 2, positive control (previously cloned partial 5'-NCR of CVB3 was used as a template); lane 3, oligo-dT primed cDNA of CVB3-Korea/97.

Table 1. Internal primers used for the overlapping sequencing of pCVB3-Korea/97

Primers	Sequences (5'-3')
F-1-F	cttccttatgtgccta
F1-1-R	aacaccttcacctcccat
F1-CON-F	tgcgaccaccattgctaga
F1-2-F	cttttgggttctgctatgg
F1-CON-R	tggtgcatcaaaattggg
F1-2-R	gtccccctgctttcatat
F1-CON2-F	aggtggactcggatgac
F1-3-R	agtgtgggatgttgattg
F1-CON2-R	tgtagtggtagcgaagcg
F1-1616-R	cgctttgatgtggaggtaa
F2-1-F	aacacaccagcaagact
F2-1-R	aacctatagtctctgcca
F2-CON-R	caagcctcagttccgtaca
F2-2-F	aaagtggcaaaaggaaatc
F2-2-R	cccttctctgctggtgt
F3-R	cctgtgggtgtattccct

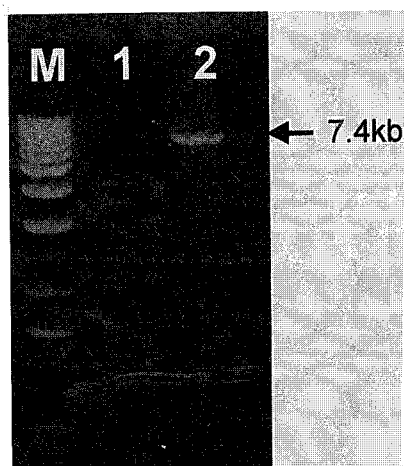


Figure 2. Amplification of the full-length cDNA of CVB3-Korea/97 by LD-PCR. An arrow indicates the PCR product (7.4 kb in size). M, 1 kb ladder; lane 1, negative control (D.W.); lane 2, amplified CVB3-Korea/97 whole genome.

행하였다. PCR 산물을 전기영동한 결과 CVB3 전체 게놈의 크기와 동일한 약 7.4 kb 크기의 DNA가 증폭되었음을 확인하였다 (Figure 2).

3. CVB3-Korea/97 전체 게놈의 클로닝과 sub-cloning

증폭된 7.4 kb의 LD-PCR 산물을 정제하여 pCR2.1-TOPO 벡터에 ligation하여 Top10F⁺ competent *E. coli* cell을 이용한 형질전환을 시도하였다. 형질전환된 *E. coli* 클론은 ampicillin이 포함된 배지를 이용하여 선택하였으며, 선택된 클론으로부터 plasmid DNA를 추출하여 insert DNA를 확인하고, 확인된 클론을 pCVB3K라 명명하였다.

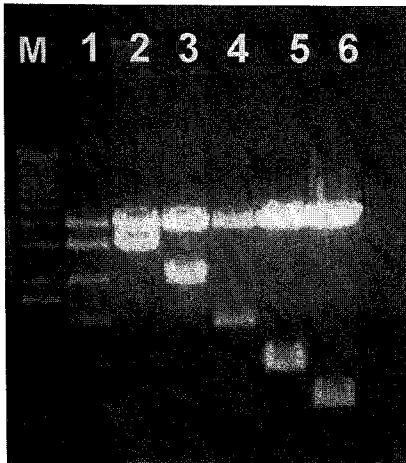


Figure 3. Gel electrophoresis of subcloned DNA fragments digested by *EcoRI*. M, 1 kb ladder; lane 1, pCVB3K full-length clone; lane 2, pCVB3K-F1; lane 3, pCVB3K-F2; lane 4, pCVB3K-F3; lane 5, pCVB3K-F4; lane 6, pCVB3K-F5.

pCVB3K를 *EcoRI*로 절단하여 그 절편을 pCR2.2 벡터에 subcloning 하였으며, 각 subclone (pCVB3K-F1~pCVB3K-F5)은 1~2 kb 정도의 크기인 것을 확인하였다 (Figure 3).

4. CVB3-Korea/97 전체 게놈분석

Subcloning된 각각의 plasmid에 대한 염기서열 분석을 실시한 결과 CVB3-Korea/97 전체 게놈은 7,400 bp로서 741 bp의 5' NCR과 6,555 bp의 open reading frame (ORF) 및 104 bp의 3' NCR로 구성되어 있음을 확인하였다. ORF는 2,185개의 아미노산을 암호화하고 있었으며 764개의 아미노산으로 구성된 외막단백질 영역과 1,421개의 아미노산으로 구성된 비구조단백질 영역으로 구성되어 있었다. 확인된 CVB3-Korea/97과 전체 게놈 염기서열을 이미 보고된 5가지의 CVB3 분리주와 비교하였다. 분석한 결과는 Lindberg 등 [17], Klump 등 [13], Tracy 등 [25], Knowlton 등 [14], Chapman 등 [7]이 보고한 sequence와 각각 81.4%, 81.8%, 81.8%, 81.7%, 81.7%의 유사성을 확인하였다 (Table 2). 또한 본 연구에서 확인된 염기서열과 보고된 염기서열을 각각의 유전자 영역으로 나누어 염기서열 유사성을 확인한 결과 Table 3과 같이 77.2%에서 90.0%의 유사성을 확인하였다. 동일한 영역의 아미노산서열 유사성은 외막단백질을 구성하는 P1영역은 84.7%, 비구조단백질을 구성하는 P3영역은 96.6%의 유사성을 확인하였다. 따라서 바이러스의 외막단백질을 암호화하고 있는 구조단백질 영역 (P1)은 염기 및 아미노산 서열에서 바이러스 유전자의 복제 및 단백질 분해 기능을 수행하는 비구조단백질 영역 (P2, P3) 및 비암호화 영역 (5' NCR, 3' NCR) 보다 유사성이

Table 2. Comparisons of nucleotide and amino acid sequences of CVB3-Korea/97 and Nancy strains

Strains	Homology (%)		References	Gene bank Accession No.
	Nucleotide	Amino acid		
Nancy	81.4	90.3	Lindberg et al. (1987)	M16572
Nancy	81.8	91.7	Klump et al. (1990)	M33854
Nancy	81.8	91.8	Tracy et al. (1992)	M21949
Woodruff	81.7	91.9	Knowlton et al. (1994)	U57056
Nancy-variant	81.7	91.7	Chapman et al. (1994)	N/A

N/A; not accessed

Table 3. Comparisons of regional homologies of CVB3-Korea/97 with CVB3 strains at the levels of nucleic acids and amino acids

Strains	Homology (%)								References
	5' NCR	P1		P2		P3		3' NCR	
	N	N	A	N	A	N	A	N	
Nancy	90.0	77.5	84.7	80.6	93.6	83.3	94.5	85.6	Lindberg et al. (1987)
Nancy	89.9	77.8	85.2	80.9	95.5	84.1	96.4	88.5	Klump et al. (1990)
Nancy	89.9	77.9	85.5	80.9	95.2	84.0	96.4	88.3	Tracy et al. (1992)
Woodruff	89.5	77.2	85.3	81.8	96.2	83.6	96.4	89.4	Knowlton et al. (1994)
Nancy-varient	89.5	77.6	85.1	80.8	95.4	84.1	96.6	87.5	Chapman et al. (1994)

N; Nucleotide sequence, A; Amino acid sequence

Table 4. Sequence variations on nucleotides and amino acids among virulent and avirulent strains of CVB3

Virus						Virulent candidate		Regions and amino acid position
virulent		avirulent		CVB3-Korea/97		N	A	
N	A	N	A	N	A			
U ²³⁴	-	C ²³⁴	-	U ²³⁴	-	C ²³⁴ → U ²³⁴	-	5' NCR
A ¹⁴⁴²	Asn ¹⁶⁵	G ¹⁴⁴²	Asp ¹⁶⁵	A	Asn ¹⁶⁵	G ¹⁴⁴² → A ¹⁴⁴²	Asp ¹⁶⁵ → Asn ¹⁶⁵	VP2/165
A ²⁹¹⁶	Asp ¹⁵⁵	G ²⁹¹⁶	Gly ¹⁵⁵	A	Arg ¹⁵⁵	G ²⁹¹⁶ → A ²⁹¹⁶	Gly ¹⁵⁵ → Asp ¹⁵⁵	VP1/155

N; Nucleotide, A; Amino acid

낮은 것으로 확인되었다.

5. 심장질환병원성 결정영역의 염기 분석

여러 연구자들에 의해 심장질환의 병원성과 관련된 것으로 알려진 CVB3 게놈의 특정 부위들의 염기서열을 본 연구 결과에서 확인된 CVB3-Korea/97의 염기서열과 비교하였다. Camero-Wilson 등 [5]은 병원성을 나타내는 바이러스의 2,916번 염기가 A^{2,916}로써 VP1의 155번 아미노산이 Asp (GAT)인 경우에서 G^{2,916}로 치환되어 Gly (GGT)으로 변화되면 심장질환의 병원성이 약독화 (attenuation)된다고 보고하였다. 본 연구에서는 CVB3-Korea/97의 경우 2,916번 염기가 AG^{2,916}G로 triplet codon 자체가 Arg를 암호화하고 있었으며 VP1 155번 염기의 주변에서 변이가 관찰되었다 (Table 4, Figure 4A). 이 사실은 비록 CVB3-Korea/97의 VP1 155번 아미노산은 Camero-Wilson 등 [5]이 약독화 주에서 분석한 바와 같이 Gly은 아니지만 CVB3-Korea/97이 심장질환이 없는 무균성 뇌막염

환자에서 분리된 바이러스라는 것을 고려해 볼 때 VP1의 155번 아미노산의 변이가 CVB3의 심장질환병원성의 중요한 부분일 가능성이 있다는 것을 확인하였다.

또한 Knowlton 등 [14]은 VP2의 165번째 아미노산이 Asn에서 Asp으로 전환됨으로써 병원성이 소실된다고 보고하였는데 CVB3-Korea/97 VP2영역의 165번 아미노산이 Asn임이 확인되었다 (Table 4). 본 연구 결과로부터 VP2를 구성하는 아미노산 중 165번 아미노산 하나의 변이는 CVB3의 병원성 결정에 중요한 요인이 아닐 가능성을 확인하였다.

5' NCR의 경우도 CVB3의 병원성 결정 요인에 대한 많은 연구가 수행되었으며, Tu 등 [26]의 연구에 의하면 234번 염기가 U일 경우 병원성을 갖는다고 보고하였다. 그러나 임상적으로 심장질환을 유발하지 않는 CVB3-Korea/97에서도 234번 염기가 U인 것으로 보아 234번 염기는 병원성 결정에는 중요하지 않은 것으로 사료된다.

Yoon Seok Chung, *et al.*: Cloning and Sequence Analysis of CVB3-Korea/97

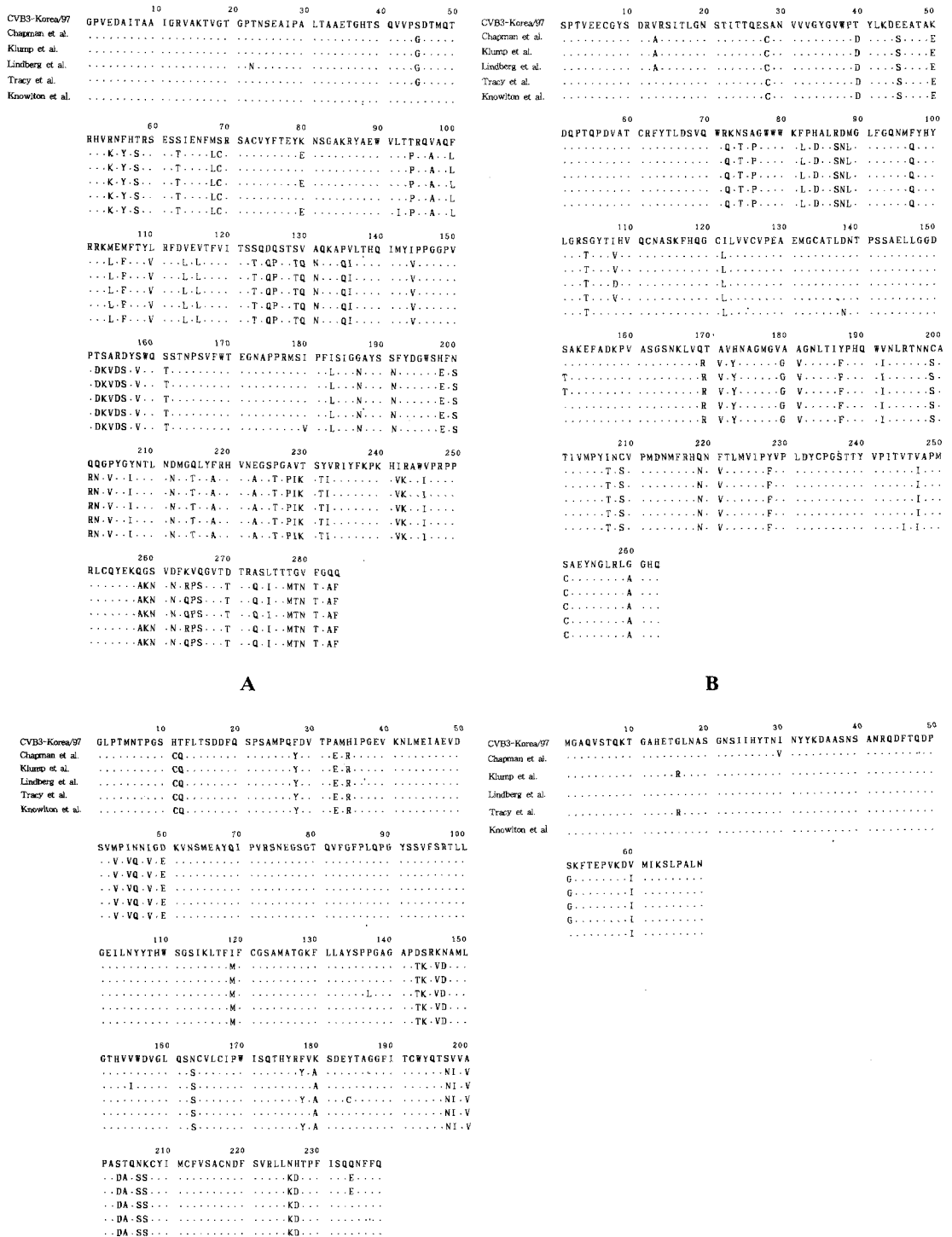


Figure 4. Comparisons of the deduced amino acid sequences of CVB3-Korea/97 with the previously reported CVB3 strains. 4(A); VP1, 4(B); VP2, 4(C); VP3, 4(D); VP4.

고찰

CVB3는 *Picornaviridae*과에 속하는 바이러스로서 인체에 무균성 뇌막염뿐만 아니라 확장성 심근증 등의 질병을 유발하는 병원체로 알려져 있다 [11, 15, 19]. 병원성을 나타내는 CVB3와 병원성을 나타내지 않는 바이러스들이 분리되면서 CVB3의 병원성 결정인자 규명을 위한 연구가 가능하게 됐으며, 이에 따라 바이러스 전체 게놈의 클로닝과 감염력 있는 재조합 cDNA 클론이나 RNA 전사체를 이용하여 바이러스의 복제기작 및 질병 유발기전에 관한 연구들이 활발하게 수행되게 되었다 [6, 7, 13, 18]. 그러나 국내의 경우 CVB3 전체 게놈의 염기서열 규명과 병원성 결정 부위의 염기변화에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 무균성 뇌막염 환자로부터 분리한 CVB3 (CVB3-Korea/97)의 전체 게놈을 LD-PCR 방법으로 증폭한 후 7.4 kb의 PCR 산물을 클로닝하여 염기서열을 결정하였고 CVB3의 원형주 (Nancy 주) 및 앞서 보고된 여러 가지 변이주의 염기서열 및 아미노산 서열을 비교함으로써 유전적 특성 및 병원성 결정 요인에 대한 염기서열의 변화를 분석하였다.

염기서열 분석결과 CVB3-Korea/97의 전체 게놈은 7,400 bp로 확인되었다. CVB3-Korea/97의 전체 염기서열 및 아미노산 서열을 원형주로 알려져 있는 Nancy주와 비교한 결과 CVB3-Korea/97의 구조단백질 영역에서 아미노산 서열은 84.7%, 염기서열은 77.5%의 유사성이 있음을 확인하였고, 비구조단백질 영역에서 아미노산 서열은 94.1%, 염기서열은 84.9%의 유사성이 있음을 확인하였다. 이 결과는 동일한 혈청형 내에서도 지역적 특성에 따라 25% 정도의 염기서열 변이가 있다고 보고한 Muir 등 [20]의 결과와 일치한다.

CVB3와 같은 RNA 바이러스는 숙주 세포 내에서 증식하는 동안 유전자 재조합 가능성이 높으며, RNA 복제시 오류를 수선 (repair)할 수 있는 기능이 존재하지 않기 때문에 염기서열상의 변이가 비교적 심하다 [20, 22]. 이러한 변이는 전체 RNA 게놈상에 나타날 수 있으나 바이러스의 증식과 관련되어 게놈 RNA를 복제하고 바이러스 단백질을 절단하여 외막을 구성하는 기능을 나타내는 단백질 분해효소 및 RNA 중합효소 등 생존에 필수적인 단백질을 암호화한 영역의 게놈 복

제 오류는 대부분 바이러스 생존에 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 반면에 구조단백질의 경우 숙주 세포 수용체 결합부위같이 바이러스의 생존에 중요한 영역도 존재하지만 그 밖의 대부분의 구조단백질을 암호화하는 영역의 변이는 바이러스의 생존에 치명적인 영향을 주지는 않는다. 따라서 본 연구에서도 CVB3-Korea/97 구조단백질 영역의 변이와는 달리 단백질 분해효소, RNA 중합효소 등 비구조단백질을 암호화하고 있는 영역의 경우 유전자의 보존성이 매우 높은 것으로 확인되었다.

특히 비구조단백질 영역에 암호화 되어 있는 단백질 분해효소 3C의 아미노산 서열 중 39번 His와 70번 Glu, 144번-148번인 Gly-X-Cys-Gly-Gly는 단백질 분해효소의 활성부위라고 알려져 있는데, CVB3-Korea/97의 경우 이 부분에서 변이가 관찰되지 않았다. 또한 RNA 의존성 RNA 중합효소 (RNA dependent RNA polymerase; RDRP)의 활성부위라고 알려져 있는 159번-163번 아미노산 (Lys-Asp-Glu-Leu-Arg), 327번-330번 아미노산 (Tyr-Gly-Asp-Asp)부분에서도 변이가 일어나지 않음을 확인하였다. 이 사실은 CVB3-Korea/97에서 바이러스의 구성 및 증식에 관련된 기능단백질을 암호화하는 부분은 잘 보존되어 있다는 것을 나타 내 주는 결과이다.

최근 들어 CVB3의 병원성 결정 요인과 염기서열 변이와의 관계를 규명하려는 연구가 해외에서 활발히 진행되고 있다 [4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 21, 26]. Tu 등 [26]은 CVB3의 병원성 결정 요인으로 5' NCR의 234번 염기가 U에서 C로 변화되었을 경우 병원성이 현저히 감소한다고 보고하였다. 반면 Chapman 등 [6]은 5' NCR의 234번 염기의 변화는 CVB3의 병원성과 관계가 없다는 보고를 하여 5' NCR의 234번 염기가 CVB3 병원성 결정에 중요한 기능을 담당한다는 사실에 대한 논란이 지속되고 있다. 본 연구에서 분석한 CVB3-Korea/97 염기서열의 경우 5' NCR의 234번 염기가 U로 확인되어 Tu 등 [26]이 주장한 병원성 주의 염기와 동일한 양상을 나타내고 있으나 CVB3-Korea/97이 심장이상을 보이지 않는 무균성 뇌막염 환자로 분리되었음을 고려해 볼 때 Chapman 등 [6]이 주장한 대로 CVB3 5' NCR의 234번 염기의 변화가 CVB3의 병원성을 결정하는 인자가 아닐 가능성이 높다고 할 수 있다. 그러나 picornavirus의 5' NCR은 바이러스 단백질의 해독 및 바이러스

RNA 복제에 중요한 역할을 수행하는 IRES를 포함하고 있으며, 5' NCR의 2차 구조 또한 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다 [6, 9, 13, 26]. 따라서 5' NCR 부위의 점돌연변이 (point mutation)를 유발시킨 후 이러한 단일 염기서열 변이가 5' NCR 2차 구조 분석 및 단백질 해독기능에 어떠한 영향을 주는지에 대한 분석은 5' NCR 부위가 CVB3의 병원성 결정과 관련되어 있는지 그리고 그중 어느 부분이 병원성의 결정에 중요한가를 밝힐 수 있는 단서를 제공할 수 있을 것이다. 본 연구에서 확보한 CVB3-Korea/97의 전체 게놈을 포함하는 클론 및 염기서열은 향후 이러한 연구 분야에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Cameron-Wilson 등 [5]은 CVB3의 CVB3 구조단백질 중 VP2 부위의 165번 아미노산이 Asn에서 Asp로 치환되면서 병원성이 소실된다고 보고하였다. 본 연구에서 분석한 CVB3-Korea/97의 경우 심장 이상이 관찰되지 않은 무균성 뇌막염 환자로부터 분리한 비병원성 주임에도 불구하고 병원성 주에서 발견되는 아미노산 (Asn)을 가지는 것으로 나타났다. Knowlton 등 [14]은 VP1을 암호화하고 있는 염기 중 2,916번 염기의 변이 (A->G)로 인해 155번 아미노산이 변화 (Asp; GAT->Gly; GGT) 함으로써 병원성이 약화된다고 보고하였다. CVB3-Korea/97은 155번 아미노산이 병원성 주에서 나타나는 Asp 또는 기존의 비병원성 주에서 보고된 Gly가 아니라 Arg로 확인되었으며 155번 아미노산에 근접한 아미노산 서열도 병원성 주와 많은 차이를 보였다 (Figure 4). CVB3의 구조단백질 중 VP1/VP2의 아미노산 서열은 CVB3의 외피단백질의 3차 구조를 결정하는 데 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러므로 CVB3-Korea/97의 VP1/VP2 부위 아미노산 서열 중 VP2의 165번 아미노산은 병원성 주와 동일한 반면 VP1 155번 아미노산 등 다른 부위의 아미노산 서열은 병원성 주와 다르다는 것을 확인하였고 지금까지 보고된 VP2의 165번 및 VP1의 155번 등 단일 아미노산의 변화 자체가 CVB3의 병원성 여부에 결정적 요인으로 작용하지 않는다는 것을 의미한다.

CVB3-Korea/97의 VP1영역의 155번 근처의 아미노산 서열이 병원성 주와 많은 차이가 있다는 본 연구 결과로부터 VP1의 아미노산 변이 또는 일련의 아미노산 군 (motif)의 변이가 바이러스의 외피구조를 3차원적으로 변화시킴으로써 CVB3

의 병원성에 영향을 미칠 수도 있다는 추론이 가능하다. 그러나 본 연구에서 분석한 바와 같이 CVB3의 어느 한 부분의 단일 염기 또는 단일 아미노산 자체의 변이 분석에 의해 정확하게 병원성 결정에 작용하는 아미노산 서열을 규명하는 것은 불가능하다. 또한 RNA 바이러스의 특성상 quasispecies viral RNA population의 존재 가능성을 완벽히 배제할 수는 없으므로 CVB3에 의한 무균성 뇌막염 환자 및 심장질환 환자로부터 바이러스 RNA를 직접 분리한 후 염기서열을 결정하여 본 연구에서 확인된 CVB3-Korea/97과 비교한다면 병원성 결정 요인에 대한 보다 정확한 유전자적 분석이 이루어 질 수 있을 것으로 생각한다.

장내바이러스에 대한 연구가 활발하지 못한 국내 상황에서 최초로 비병원성 CVB3 전체 염기서열을 확인한 본 연구 결과는 향후 CVB3의 병원성 결정인자 규명 및 지역적 변이에 따른 항원성 분석 등 장내바이러스의 분자유전학적 연구에 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) 김기순, 김지은, 천두성, 정윤석, 박정구, 강영화, 이운성, 지영미, 윤재득, 이영진, 김동수, 김문보, 나병국, 송철용, 이광호: 국내에서 유행한 무균성 뇌막염 원인바이러스의 규명; 1993~1998. *감염* 31: 382-389. 1999.
- 2) Andreoletti L, Hober D, Becquart P, Belaich S, Copin MC, Lambert V, Wattre P: Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: Evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J Med Virol* 52: 206-214, 1997.
- 3) Bergelson JM, Mohany JG, Crowell RL, John NF, Lublin DM, Finberg RW: Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-acceleration factor (CD55). *J Virol* 69: 1903-1906, 1995.
- 4) Caggana M, Chan P, Ramsingh A: Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype. *J Virol* 67: 4797-4803, 1993.

- 5) **Cameron-Wilson CL, Pandolfino YA, Zhang HY, Pozzeto B, Archard LC:** Nucleotide sequence of an attenuated mutant of coxsackievirus B3 compared with the cardiovirulent wild type: Assessment of candidate mutation by analysis of a revertant to cardiovirulence. *Clin Diagn Virol* **9**: 99-105, 1998.
- 6) **Chapman NM, Romero J, Pallansch MA, Tracy S:** Sites other than nucleotide 234 determine cardiovirulence in natural isolates of coxsackievirus B3. *J Med Virol* **52**: 258-261, 1997.
- 7) **Chapman NM, Tu Z, Tracy S, Gauntt CJ:** An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackievirus B3 strain: Its complete sequence analysis and comparison to the genomes of cardiovirulent coxsackievirus. *Arch Virol* **135**: 115-130, 1994.
- 8) **Gauntt CJ, Trousdale MD, LaBadie DRL, Paque RE, Nealon T:** Properties of coxsackievirus B3 variants which are amyocarditic or myocarditic for mice. *J Med Virol* **3**: 207-220, 1979.
- 9) **Gromeier M, Bossert B, Arita M, Nomoto A, Wimmer E:** Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence: *J Virol* **73**: 958-964, 1999.
- 10) **Hein A, Grumbach I, Hake S, Muller G, Pring-Akerblom P, Mall G, Figella HR:** Enterovirus heart disease of adults: A persistent, limited organ infection in the presence of neutralizing antibodies. *J Med Virol* **53**: 196-204, 1997.
- 11) **Kandolf R, Klingen K, Mertsching H, Canu A, Hohenad C, Zell R, Reimann BY, Heim A, McManus BM, Foulis AK, Schultheiss HP, Erdmann E, Riecker G:** Molecular studies on enteroviral heart disease: Pattern of acute and persistent infection. *Eur Heart J* **12**: 49-55, 1991.
- 12) **Kang Y, Chatterjee NK, Nodwell MJ, Yoon JW:** Complete nucleotide sequence of a strain of coxsackie B4 virus of human origin that induces diabetes in mice and its comparison. *J Med Virol* **44**: 353-361, 1994.
- 13) **Klump WM, Bergmann I, Muller BC, Ameis D:** Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: Two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol* **64**: 1573-1583, 1990.
- 14) **Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S:** A mutation in the Puff region of VP2 attenuates the myocarditis phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* **70**: 7811-7818, 1996.
- 15) **Lee C, Maull E, Chapman NM, Tracy S, Wood J, Gauntt C:** Generation of an infectious cDNA of a highly cardiovirulent coxsackievirus B3 (CVB3m) and comparison to other infectious CVB3 cDNAs. *Vir Res* **50**: 225-235, 1997.
- 16) **Lindberg AM, Polacek C, Hohansson S:** Amplification and cloning of complete enterovirus genomes by long distance PCR. *J Virol Meth* **65**: 191-199, 1997.
- 17) **Lindberg AM, Stilhandske PK, Pettersson U:** Genome of coxsackievirus B3. *Virology* **156**: 50-63, 1987.
- 18) **Lingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B, Kandolf R:** Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: Virus dissemination and immune cell targets. *J Virol* **70**: 8888-8895, 1996.
- 19) **McManus BM, Cassling RS, Gauntt CJ:** Immunological basis of myocardial injury. *Cardiovas Clin* **18**: 163-184, 1987.
- 20) **Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator G, van Loon AM:** Molecular typing of enteroviruses: Current status and future requirements. *Clin Micro Rev* **11**: 202-227, 1998.
- 21) **Rinehart JE, Gomez RM, Roos RP:** Molecular determinants for virulence in coxsackievirus B1 infection. *J Virol* **71**: 3986-3991, 1997.
- 22) **Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M:** Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol* **73**: 8741-8749, 1999.
- 23) **Tracy S, Chapman NM, McManus BM, Pallansch MA, Beck MA, Carstens J:** A molecular and serologic evaluation of enteroviral involvement in human myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **22**: 403-414, 1990.
- 24) **Tracy S, Chapman NM, Romer J, Ransingh**

- A:** Genetics of coxsackievirus B cardiovirulence and inflammatory heart muscle disease. *Trends Microbiol* **4**: 175-179, 1996.
- 25) **Tracy S, Chapman NM, Tu Z:** Coxsackievirus B3 from an infections cDNA copy of the genome is cardiovirulent in mice. *Arch Virol* **122**: 399-409, 1992.
- 26) **Tu Z, Chapman NM, Hufnangel G, Tracy S, Romero J, Barry WH, Zhao L, Currey K, Shapro B:** The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol* **69**: 4607-4618, 1995.
- 27) **Zhang G, Haydon DT, Knowles NJ, McCauley JW:** Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol* **80**: 639-651, 1999.
- 28) **Zoll GJ, Melchers WJG, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJA, Galama JMD:** General primer mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: Application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* **30**: 160-165, 1992.
-