

## 돼지 로타바이러스(Gottfried 주)의 VP4 항원구조분석

송윤경 · 김원용\* · 강신영

충북대학교 수의과대학/동물의학연구소

\*중앙대학교 의과대학

(2001년 8월 10일 게재승인)

### Analysis of antigenic sites on the VP4 of porcine rotavirus, Gottfried strain

Yun-kyung Song, Won-yong Kim\*, Shien-young Kang

Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

\*College of Medicine, Chungang University

(Accepted by August 10, 2001)

**Abstract :** The neutralization epitopes of the outer capsid protein VP4 of a porcine rotavirus, Gottfried strain, were studied using neutralizing monoclonal antibodies(N-MAbs). Eight N-MAbs which are specific for the VP4 of Gottfried strain were used for analyzing the antigenic sites of VP4. Three different approaches were used for this analysis; i) testing the serological reactivity of each N-MAb against different G and P types of human and animal rotaviruses ii) analyzing N-MAb-resistant viral escape mutants and iii) performing nucleotide sequence analysis of the VP4 gene of each N-MAb-resistant viral escape mutant. From experimental results, at least four antigenic sites(I, II, III, and IV) were identified. Antigenic site I recognized by N-MAbs 24B9, 23G10, and 26A2 was separated from antigenic site II recognized by N-MAbs 30H5, 32B3, and 29B3. However, these antigenic sites were overlapped with antigenic site III recognized by N-MAB 21A1. The other antigenic site IV recognized by N-MAB 16D2 was separated from antigenic sites I, II, and III.

**Key words :** Rotavirus, VP4, antigenic site, N-MAb resistant escape mutant, SSCP

## 서 론

로타바이러스는 사람 뿐만 아니라 포유류의 어린동물 그리고 조류에서 급성 설사를 유발하는 병원체로 알려져 있다<sup>1-3</sup>. *Reoviridae* 과에 속하는 로타바이러스는 피막이 없으며 직경 75 nm의 icosahedral 형태로 되어 있다<sup>3,4</sup>. 바이러스 입자는 11개의 분절로 된 dsRNA가 triple-layered capsid에 의해 둘러싸여 있으며 11개의 dsRNA 분절은 polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에서 이동 순서에 따라 유전자(gene) 1에서 11까지 번호가 붙여졌다. 이들 유전자는 6개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 그리고 VP7)과 5개의 비구조단백질(NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 그리고 NSP5)를 각각 coding 한다.

Triple-layered capsid는 VP1, VP2 그리고 VP3를 포함하는 core protein, VP6로 구성되어 있는 inner capsid 그리고 VP7과 VP4로 이루어진 outer capsid로 되어 있다<sup>3-7</sup>.

로타바이러스는 항원성 및 염기서열에 따라 group, subgroup, serotype, 그리고 genotype으로 분류된다. Group은 PAGE를 통한 유전자 이동성과 혈청학적 방법에 의해 A에서 G 까지 7개의 group으로 나뉘며 group antigen의 하나인 VP6을 기초로 하여 subgroup으로 구분된다<sup>4,8-10</sup>. Serotype은 RNA 분절 7, 8 또는 9에 의해 암호화되는 VP7의 혈청학적 분석에 의한 G(Glycoprotein) serotype과 RNA 분절 4에 의해 암호화되는 VP4에 의해 P(Protease sensitive protein) serotype으로 구분된다. 또한 VP4의 염기서열 분석에 따라 P genotype으로 분류되는

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-1999-041-G00148)

Address reprint requests to Dr. Shien-young Kang, Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea (E-mail: sykang@cbucc.chungbuk.ac.kr)

데 분석된 P serotype과 P genotype은 거의 일치를 보인다<sup>11</sup>. Outer capsid를 구성하는 구조단백질 VP7과 VP4는 중화항체를 유도하는 단백질로 동물에서 방어면역에 관련되어 있으며 현재 백신개발에 있어서 중요한 후보로 연구되고 있다<sup>12</sup>. 로타바이러스의 구조단백질 VP4는 VP7이 주를 이루는 outer capsid로부터 돌출된 spike 형태를 취하고 있는 unglycosylated protein으로 숙주세포에 부착 및 침입, 혈구응집, 바이러스중화, 병원성, 숙주 범위 및 선택적인 membrane permeabilization 등에 있어서 중요한 기능을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다<sup>13,14</sup>. 로타바이러스의 감염은 protease 처리에 의하여 증가를 보이게 되는데 이렇게 protease(trypsin)로 처리할 경우 구조단백질 VP4는 VP8\*과 VP5\*로 나뉘어지게 되며 결과적으로 감염이 활성화되는 것으로 알려져 있다<sup>13,14</sup>.

사람 로타바이러스의 구조단백질 VP4의 중화관련부위를 확인하기 위하여 여러 가지의 중화단크론항체(N-MAb)가 이용되었으며 그 결과 VP5\*에서 교차반응에 관련된 부위와 serotype에 특이적인 부위 그리고 strain에 특이적인 부위가 확인 보고되었다<sup>15-18</sup>. 또한 사람 로타바이러스 KU, DS-1, 1076 strain의 VP5\*와 VP8\*의 재조합 발현 단백질을 이용하여 항원성을 분석 결과 VP8\*은 serotype 특이성을 결정하는 부위인 반면 VP5\*는 서로 다른 VP4 serotype 사이의 교차반응에 관여하는 부위를 지니고 있음이 확인되었다<sup>19</sup>. 또한 VP8\*을 A(amino acid 1-102), B(amino acid 84-180) 그리고 C(amino acid 150-246) 부위로 나누어 발현시킨 단백질을 이용하여 VP8\*의 항원성을 분석한 결과 A와 C 부위는 VP8\*에서 conserved 되어 있는 부분으로 heterotype의 사람 로타바이러스와 교차반응에 관여하는 부분으로 확인되었으며 B에는 serotype, subtype에 대해 특이적인 epitope이 존재하며 이 부분은 conformational한 부위로 확인되었다<sup>20</sup>.

본 연구에서는 돼지 설사 분변으로부터 흔히 분리되는 돼지 로타바이러스 혈청형 중의 하나인 Gottfried strain<sup>21</sup>의 구조단백질 VP4에서 중화에 관련된 부위를 규명하기 위하여 Gottfried strain의 VP4에 특이적으로 반응하는 N-MAb을 이용하여 각각의 N-MAb와 G serotype과 P serotype이 서로 다른 사람 및 동물 로타바이러스와의 중화 반응성을 조사하였다. 또한 각각의 N-MAb에 저항성을 보이는 escape mutant를 작성하여 분석하였으며 single-strand conformational polymorphism(SSCP)법을 이용하여 escape mutant의 VP4 유전자 염기서열을 확인하고 parent virus인 Gottfried strain의 VP4 유전자의 염기서열과 비교 분석하여 변화된 염기를 확인함으로써 Gottfried strain의 VP4에서 중화에 관련된 부위를 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스와 세포

돼지 로타바이러스 표준주로 Gottfried(G4/P2B)와 OSU(G5/P9), 소 로타바이러스 표준주로 NCDV(G6/P6)와 B223(G10/P8)를 사용하였으며 병원성이 있는 사람 로타바이러스로 Wa(G1/P1A), DS-1(G2/P1B), M(G3/P1A), VA70(G4/P1A) 그리고 병원성이 없는 사람 로타바이러스로 M37(G1/P2A), 1076(G2/P2A), McN13(G3/P2A), ST-3(G4/P2A)를 각각 사용하였다. 각각의 로타바이러스는 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포에 Eagle's minimum essential medium(EMEM)을 이용하여 Kang *et al*<sup>22</sup>의 방법에 따라 배양하였다.

### 중화단크론항체

돼지 로타바이러스 Gottfried strain의 VP4에 특이적으로 반응하는 중화단크론항체인 23G10, 24B9, 26A2, 29B3, 32B3, 30H5, 21A1, 16D2와 VP7에 특이적으로 반응하는 중화단크론항체 36H9은 오하이오 주립 대학교의 Dr. L.J. Saif로부터 분양 받아 사용하였다.

### Plaque reduction virus neutralization(PRVN) test

사람 로타바이러스와 동물 로타바이러스에 대한 단크론항체의 중화역가는 PRVN 법<sup>23</sup>으로 측정하였다. 간략히 기술하면 4-fold dilution 범으로 희석한 복수와 동량의 바이러스(60-80PFU/0.1 ml)를 섞은 후 37°C에서 1시간 작용시킨 후 MA104 세포가 단층 배양되어 있는 6-well plate에 접종하였다. 37°C에서 1시간 배양한 후 plate를 혈청이 첨가되어 있지 않은 EMEM으로 1회 세척한 뒤 agar medium(0.8% noble agar, 67 µg neutral red/ml, 25 µg pancreatin/ml)을 4 ml 씩 각 well에 첨가한 후 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 37°C 배양기에서 4~5일 배양하였다. 대조군과 비교하여 plaque의 수가 60%로 감소된 복수의 희석배수의 역수를 단크론항체의 중화역가로 하였다.

### Fluorescent Focus Neutralization(FFN) test

순수 분리된 각각의 escape mutant와 각각의 중화단크론항체와의 중화반응관계는 FFN 법<sup>23</sup>으로 확인하였다. 간략히 기술하면 1:100으로 희석한 각각의 N-MAb에 동량의 escape mutant(10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>/ml)를 섞은 후 37°C에서 1시간 작용시킨 후 MA104 세포가 단층 배양되어 있는 96-well plate에 접종하였다. 37°C에서 1시간 배양한 후 plate를 혈청이 첨가되어 있지 않은 EMEM으로 1회 세척한 뒤 pancreatin(Gibco BRL)이 25 µg/ml로 함유되어 있는 유지배지를 각 well에 100 µl 씩 첨가한 후 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 37°C 배양기에서 24시간 배양하였

다. 24시간 배양 후 감염된 세포를 80% acetone으로 고정하고 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체와 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Jackson ImmunoResearch Lab.)를 이용하여 형광염색하였다. 형광현미경으로 검경 후 대조군과 비교하여 fluorescent focus의 수가 70% 이상 감소된 경우 중화반응에 sensitive 한 것으로, 30% 미만 감소된 경우에는 resistant 한 것으로, 그리고 30-70% 감소된 경우에는 부분적으로 resistant 한 것으로 판정하였다. VP7에 특이적으로 반응하는 단클론항체 36H9과 porcine anti-Gottfried 항혈청을 대조군으로 사용하였다.

### Escape mutant 작성

VP4에 특이적인 중화단클론항체에 저항성이 있는 Gottfried strain의 escape mutant는 Taniguchi *et al*<sup>24</sup>을 일부 수정하여 작성하였다. 즉, 10-fold dilution 법으로 희석한 돼지 로타바이러스 Gottfried strain 100  $\mu$ l와 1:25에서 1:500으로 희석한 동량의 복수를 섞어 37°C에서 1시간 반응시켰다. MA104 세포가 단층 배양되어 있는 roller tube에 반응액을 접종하고 37°C에서 1시간 배양하였다. 배양한 후 혈청이 첨가되어 있지 않은 EMEM으로 감염 세포를 1회 세척하고 1:500 또는 1:2000으로 희석한 복수와 pancreatin 25  $\mu$ g/ml을 포함하고 있는 무혈청 배지를 첨가하여 7일간 회전 배양하였다. 7일간 배양 후 형광항체법으로 escape mutant의 증식을 확인하고 FFN 법으로 단클론항체에 대한 저항성을 확인하였다. 확인 후 위의 같은 방법으로 바이러스중화 및 증식실험을 2회 반복하여 생산된 escape mutant는 2회의 연속 plaque assay 법으로 순수 분리하였다. 순수 분리한 escape mutant는 중화 대상이 되는 단클론항체의 명칭 앞에 v-를 붙여 명명하였다.

### Escape mutant의 분석

순수 분리한 escape mutant는 single-strand conformational

polymorphism(SSCP) 법으로 분석하였으며 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

#### 1. 바이러스 핵산 추출 및 정제

각각의 escape mutant와 parent virus로부터 Rosen *et al*<sup>7</sup>의 방법으로 핵산을 추출하고 RNaid w/spin kit(BIO 101)을 이용하여 제조사의 술식에 따라 순수하게 정제하였다. 즉, DEPC(Diethylpyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 부유시킨 RNA에 RNA binding salt 3 volumes을 넣어 잘 섞은 다음 RNA 1  $\mu$ g 당 RNaid matrix를 1  $\mu$ l 첨가하여 실온에서 5분간 방치시킨 후 원심하여 RNA/RNaid matrix 복합체를 침전시켰다. 상층액은 제거하고 RNA wash solution 500  $\mu$ l를 넣고 재부유시킨 후 원심 분리하였다. 이러한 세척과정을 3회 반복한 후 pellet을 DEPC 처리된 증류수(10-20  $\mu$ l/5  $\mu$ l RNaid matrix)에 재부유시켜 45-55°C에서 5분 동안 방치한 후 원심 분리하여 상층액을 얻었다.

#### 2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

VP4 유전자는 VP4 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR 법으로 증폭하였다. 전체 VP4 유전자를 증폭하기 위해 VP4 유전자를 427-510 bp 크기로 일부분이 overlapping 되도록 Fig 1과 같이 5개의 단편으로 나누고 각각의 부위를 증폭할 수 있도록 primer를 제작하였다. 각각의 부위에 대한 primer는 이미 보고된 Gottfried

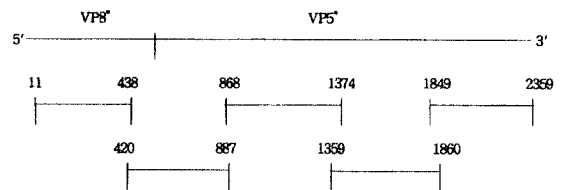


Fig 1. RT-PCR derived cDNA fragments of VP4 used for SSCP analysis.

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR to amplify the partial VP4 genes

Fragments	Primer sequences (5'→3')	Positions
A	Forward : GGCTATAAAATGGCTTCGCT	1-20
	Reverse : AAACATTTCAAAGAATTTTC	420-438
B	Forward : GAAATTCTTTGAAATGTTTA	420-439
	Reverse : ACTTCTGACCAITTTATAACC	868-887
C	Forward : GGTTATAAATGGTCAGAAGT	868-887
	Reverse : ATTCGGATTAGCTGCTGG	1357-1374
D	Forward : AGCAGCTAATCCGAATAAT	1359-1377
	Reverse : TCTTTACTAATAGCTGAC	1842-1860
E	Forward : ATTAGTAAAAGACTTAGAT	1849-1867
	Reverse : GGTCACATCCTCTATAGAG	2341-2359

strain의 염기서열을 이용하여 Table 1과 같이 제작하였다. 추출하여 정제한 RNA 5 µ에 DMSO(Dimethylsulfoxide, Sigma) 1 µ를 넣고 95°C에서 5분간 가열한 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5-10초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 60.5 µl, 10× first strand buffer 10 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 8 µl, dNTP(each 2.5 mM) 8 µl, forward primer 2.5 µl, reverse primer 2.5 µl, Taq DNA polymerase(5 U/µl, Takara) 0.5 µl, RNase inhibitor 0.5 µl, reverse transcriptase(200 U/µl, Gibco BRL) 0.5 µl을 순서대로 첨가하여 전체 반응 용량 100 µl를 pre-PCR(37°C/90 min, 95°C/5 min), PCR(denaturation 94°C/1 min, annealing 42°C/1 min, extension 72°C/2 min, 35 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 각각의 유전자 크기는 1 kb DNA ladder(Gibco BRL)를 같이 전기영동함으로써 확인하였다. 증폭된 유전자는 PCR Clean up-M kit(Viogene)을 이용하여 제조사의 술식에 따라 순수하게 정제하였다.

### 3. SSCP

SSCP는 Kirkwood *et al*<sup>25</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 간략히 기술하면 parent virus와 escape mutant로부터 추출하여 정제한 RNA를 5개의 단편으로 나누어 제작한 primer를 이용하여 RT-PCR 법으로 VP4 유전자를 증폭하였다. 증폭한 cDNA는 PCR Clean up-M kit를 이용하여 순수정제하고 증류수에 부유시켰다. 각각의 순수정제한 cDNA를 loading buffer(95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)과 혼합하여 95°C에서 4분간 가열한 후 즉시 얼음에 방치시켰다. 변성된 cDNA 단편을 TBE buffer(89 mM Tris-borate, pH8.3/4 mM EDTA)를 이용하여 5% glycerol이 함유된 6% polyacrylamide gel에 전기영동하였다. 전기영동은 4°C에서 3-4시간 동안 실시하였으며 전기영동이 끝난 후 gel은 고정하여 silver staining을 실시하였다.

### cDNA 크로닝 및 염기서열 분석

SSCP 분석 후 gel 상에서 이동 변화가 있는 VP4 cDNA 단편을 확인하여 pGEM T easy vector system II(Promega)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 크로닝하였다. 확인된 분획의 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 도달한 후 형질전환된 *Escherichia coli* cell을 도달

하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 LB/ampicillin/IPTG/X-gal 배지에서 하얀 집락만을 골라내어 ampicillin이 첨가된 LB broth 5 ml에 접종하고 37°C에서 10시간 동안 현탁 배양하였다. 배양된 *Escherichia coli*로부터의 플라스미드 추출은 Chowdhury에 의한 one step plasmid mini-preparation 법<sup>26</sup>을 사용하였다. 추출된 플라스미드는 EcoRI(10 U/µl, Gibco BRL)으로 37°C에서 1시간 반응하여 벡터와 insert를 자른 후 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 insert의 삽입유무와 크기를 확인하였다. cDNA의 염기서열 결정은 automatic sequencer 310 (Perkin-Elmer Biosystem)을 이용하여 수행하였으며 염기서열분석은 Clustal W 프로그램을 이용하였다.

## 결 과

### Plaque reduction virus neutralization(PRVN) test

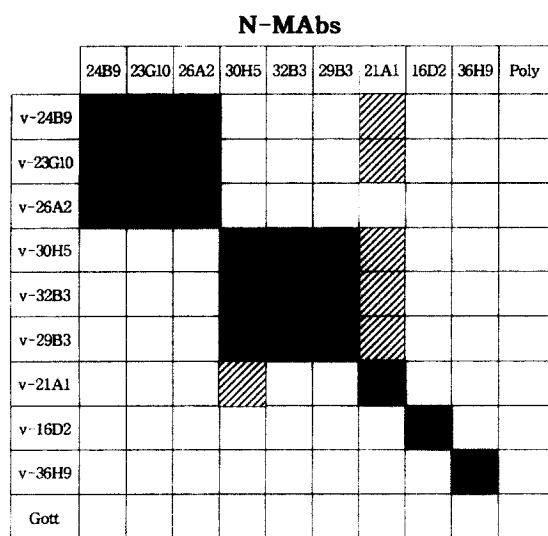
VP4에 특이적인 중화단크론항체와 혈청형이 서로 다른 사람 및 동물 로타바이러스와의 반응관계를 PRVN 법으로 확인한 결과는 Table 2와 같다. 반응양상에 따라 본 실험에 사용된 VP4에 특이적인 중화단크론항체는 네 개의 Group(Group 1-4)으로 구분되었다. 즉 3개의 단크론항체(Group 1: 23G10, 24B9, 26A2)는 병원성이 있는 사람 로타바이러스와 병원성이 없는 사람 로타바이러스 모두를 중화시킬 수 있었다. 반면에 3개의 단크론항체(Group 2: 29B3, 32B3, 30H5)는 병원성이 있는 사람 로타바이러스는 중화시킬 수 있으나 병원성이 없는 사람 로타 바이러스는 중화시키지 못하였다. 하나의 단크론항체(Group 4: 16D2)는 병원성이 있는 사람 로타바이러스는 중화시키지 못하였으나 병원성이 없는 사람 로타 바이러스는 낮은 수준으로 중화시켰다. 하나의 단크론항체(Group 3: 21A1)은 본 실험에서 사용된 사람 로타 바이러스를 어느 것도 중화시키지 못하였다. 모든 VP4 특이 단크론항체는 본 실험에 사용된 동물 로타바이러스를 중화시키지 못하였다.

### Escape mutant의 분석

순수 분리된 각각의 escape mutant와 각각의 중화단크론항체와의 중화반응관계를 FFN 법으로 확인한 결과는 Fig 2와 같다. Group 1(24B9, 23G10, 26A2)에 속하는 중화단크론항체에 대한 각각의 escape mutant인 v-24B9, v-23G10, v-26A2는 각각의 중화단크론항체의 중화반응에 저항성을 보인 것은 물론 같은 Group에 속하는 다른 중화단크론항체에 대해서도 저항성을 보였다. 특히 v-24B9와 v-23G10은 Group 3에 속하는 중화단크론항체인 21A1에 대해서도 부분적인 저항성을 보였다. Group 2(30H5, 32B3, 29B3)에 속하는 중화단크론항체

**Table 2.** PRVN titers of Gottfried VP4-specific MAbs against homologous virus, symptomatic and asymptomatic human and animal rotaviruses

Groups	MAbs (Ascites)	Titers against rotaviruses											
		Gottfried (G4/2B)	Symptomatic human rotaviruses				Asymptomatic human rotaviruses				Animal rotaviruses		
			(G/P serotype)				(G/P serotype)				(G/P serotype)		
			Wa (G1/1A)	DS-1 (G2/1B)	M (G3/1A)	VA70 (G4/1A)	M37 (G1/2A)	1076 (G2/2A)	McN13 (G3/2A)	ST-3 (G4/2A)	OSU (G5/9)	NCDV (G6/6)	B223 (G8/8)
1	23G10	15,700	1,100	24	370	16	52	33	100	50	<4	<4	<4
	24B9	13,700	1,500	32	415	20	60	74	330	84	<4	<4	<4
	26A2	8,250	620	61	345	17	25	35	290	50	<4	<4	<4
2	29B3	320	16	256	25	24	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
	32B3	215	9	180	35	18	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
	30H5	285	6	150	25	20	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
3	21A1	1,290	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
4	16D2	1,450	<4	<4	<4	<4	7	40	4	36	<4	<4	<4



**Fig 2.** Antigenic mapping of VP4 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. A panel of VP4-specific N-MAbs was tested for neutralization with parent virus(Gott) and N-MAbs-resistant viral escape mutants by FFN test. The viral escape mutants were designated as resistant(■), partially resistant(▨) or sensitive(□) against each N-MAbs. 36H9 : VP7-specific MAb, Poly : polyclonal porcine anti-Gottfried serum.

에 대한 각각의 escape mutant 인 v-30H5, v-32B3, v-29B3 도 각각의 중화단크론항체의 중화반응에 저항성을 보인 것은 물론 같은 Group에 속하는 다른 중화단크론항체에 대해서도 저항성을 보였다. 또한 이들 모두 Group 3에 속하는 중화단크론항체인 21A1에 대해서도 부분적인 저항성을 보였다. 반면에 Group 3에 속하는 중화단크론항

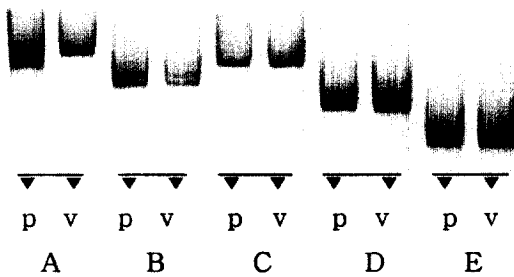
체 21A1에 대한 escape mutant 인 v-21A1은 Group 2에 속하는 중화단크론항체 30H5에 의해 부분적으로 저항성을 보였으나 21A1에 대해서는 완전한 저항성을 보였다. 중화단크론항체 16D2에 대한 escape mutant 인 v-16D2는 16D2에만 중화반응에 저항성을 보이고 다른 중화단크론항체에 대해서는 감수성을 보였다. 본 실험에서 대조군으로 사용한 Gottfried strain의 VP7 특이 단크론항체인 36H9에 대한 escape mutant v-36H9는 36H9에만 중화반응에 저항성을 나타내고 다른 중화단크론항체에 대해서는 중화반응에 감수성을 나타내었다.

**Single-strand conformational polymorphism(SSCP) analysis**

Escape mutant와 parent virus 사이에 변화된 염기를 확인하기 위하여 SSCP 법을 수행한 결과, 중화단크론항체 30H5에 대한 escape mutant와 parent virus 인 Gottfried strain의 경우 이들 바이러스의 각각의 B, C, D, 그리고 E 단편은 함께 이동하여 하나의 band 만이 나타난 반면 A 단편은 서로 다르게 이동하여 2개의 band가 gel 상에서 관찰되었다(Fig 3). 같은 방법으로 escape mutant v-32B3, v-29B3, v-21A1의 변화된 염기를 확인하기 위하여 SSCP 법으로 분석한 결과 이들 모두 v-35H5와 마찬가지로 A 단편이 서로 다르게 이동되는 것을 확인하였다. 하지만 v-24B9, v-26A2 그리고 v-23G10의 경우는 C 단편이 서로 다르게 이동하였으며 v-16D2의 경우 E 단편이 서로 다르게 이동되는 것을 확인하였다.

**Escape mutant의 염기 및 아미노산서열 분석**

Escape mutant와 parent virus 사이에 변화된 염기의 정확한 위치를 확인하기 위하여 SSCP 법으로 이동성에



**Fig 3.** Single-strand conformational polymorphism(SSCP) analysis of rotavirus VP4.

p : parent virus(Gottfried strain), v : N-Mab-resistant viral escape mutant

**Table 3.** Nucleotide and amino acid sequence changes found in the viral escape mutants selected with VP4-specific neutralizing monoclonal antibodies (N-MABs)

Escape mutant	Codon change	Amino acid change (Position)
v-24B9	GCA - ACG	Ala - Thr(392)
v-23G10	GCA - ACG	Ala - Thr(392)
v-26A2	GAC - AAC	Asp - Asn(385)
v-30H5	CAG - CGG	Gln - Arg(70)
v-32B3	CAG - CGG	Gln - Arg(70)
v-29B3	CAG - CGG	Gln - Arg(70)
v-21A1	GAA - GGA	Glu - Gly(109)
v-16D2	GAA - AAA	Glu - Lys(641)

차이가 있는 것으로 확인된 단편의 염기서열을 분석하여 비교한 결과는 Table 3과 같다. v-30H5의 경우 SSCP법에 의하여 이동성에 차이가 없었던 B, C, D 그리고 E 단편과 parent virus의 B, C, D 그리고 E 단편 사이에 염기서열에 변화가 없었으며 cDNA 이동에 차이가 있었던 A 단편에서만 Adenine이 Guanine으로 변화되었으며 이로 인하여 이미노산도 Glutamine에서 Arginine으로 변화되었다. 같은 방법으로 escape mutant의 염기서열을 분석한 결과 교차중화반응을 보이는 Group 1에 속하는 N-MAB을 이용하여 작성한 v-24B9와 v-23G10은 C 단편의 392번째 아미노산에서, v-26A2는 385번째 아미노산에서 변화가 확인되었다. Group 2의 N-MAB에 대한 escape mutant인 v-30H5, v-32B3, 그리고 v-29B3은 모두 A 단편의 70번째 아미노산에서 변화가 확인되었다. Gottfried strain에 특이적으로 반응하는 N-MAB 21A1에 대한 escape mutant인 v-21A1의 염기 및 아미노산서열 분석 결과 A 단편의 109번째 아미노산에서 그리고 병

원성이 없는 사람 로타바이러스만을 중화시킨 16D2에 대한 escape mutant인 v-16D2는 E 단편의 641번째 아미노산에서 각각 변화가 확인되었다.

## 고 찰

로타바이러스에서 VP4와 VP7은 독립적으로 중화항체형성에 관여하는 구조단백질로 알려져 있으며 VP4와 VP7에서 중화항체형성에 관여하는 항원구조를 규명하기 위하여 이들에 특이적으로 반응하는 중화단크론항체와 이를 이용한 escape mutant를 이용한 많은 연구가 수행되었다<sup>17,22,24,25</sup>. 본 연구에서는 돼지 로타바이러스 중의 하나인 Gottfried strain의 구조단백질인 VP4에서 바이러스 중화에 관련된 항원부위를 규명하기 위하여 Gottfried strain의 VP4에 특이적으로 반응하는 8개의 중화단크론항체를 이용하여 3단계로 연구를 수행하였다. 즉 혈청학적인 방법으로 각각의 중화단크론항체와 G serotype과 P serotype이 서로 다른 사람 및 동물 로타바이러스와의 중화반응성을 plaque 중화시험법으로 조사하였다. 또한 각각의 중화단크론항체에 저항성을 보이는 escape mutant를 작성하여 분석하고 이들의 VP4 유전자 염기서열을 확인하여 변화된 염기를 확인하였다.

연구 결과 Gottfried strain의 VP4 구조단백질에는 적어도 4개의 중화에 관련된 항원부위가 존재하고 있는 것을 확인하였다. 교차 반응 특이성을 보이는 부위로 VP5\*의 385번째 아미노산(aa385)과 aa392 그리고 VP8\*의 aa70이 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었고, P2 serotype에 대해 특이적인 부위로 VP5\*의 aa641을 확인하였으며 Gottfried strain에 특이적인 부위로 VP8\*의 aa109을 확인할 수 있었다. VP4에 특이적인 N-MAB과 G serotype과 P serotype이 서로 다른 사람 및 동물 로타바이러스를 이용하여 실시한 혈청학적 분석결과 Gottfried strain은 돼지 로타바이러스인 OSU, 소 로타바이러스인 NCDV와 B223 보다 사람 로타바이러스와 반응성이 더 큰 것으로 확인되었는데 이는 VP7에 의해 결정되는 G serotype은 서로 다르지만 VP4에 의해 결정되는 P serotype이 돼지와 소 로타바이러스보다 사람 로타바이러스와 유사하기 때문인 것으로 추정되며 Gottfried strain에 대한 escape mutant의 염기서열변이를 확인한 결과 사람 로타바이러스에 대한 escape mutant 분석 결과와 유사한 것도 이와 같은 맥락을 보이는 것으로 생각된다.

Mackow *et al*<sup>15</sup>과 Kirkwood *et al*<sup>17</sup>은 사람 로타바이러스와 원숭이 로타바이러스의 구조단백질 VP4의 항원 분석결과 VP8\*에서 aa72, aa88, aa148이 교차반응에 관련된 부위로 확인하였고 aa87, aa89, aa100, aa114, aa148,

aa150, aa188 그리고 aa217은 homotype 이나 제한된 heterotype과 반응성에 관여하는 부위로 보고하였다<sup>15-17</sup>. 본 실험에서는 VP8\*에 대해 serotype P1A와 P2B 사이의 교차반응에 관여하는 aa70과 Gottfried strain에 특이적인 반응을 보이는 aa109이 확인되었는데 aa70의 위치가 교차반응과 관련되어 있다는 실험결과는 이전에 확인된 것과 유사한 결과를 보여주고 있으며 로타바이러스 VP8\*의 A(aa1-102)와 C(aa150-246)는 아미노산서열이 잘 보존되어 있어 교차반응에 관련되어 있다<sup>19</sup>는 이전의 실험결과와 같은 맥락을 보여준다. 반면 Gottfried strain에 특이적인 부위인 aa109는 본 실험을 통해 처음 확인된 것이다. 이 부위는 escape mutant와 N-MAb 사이의 중화 반응성 시험결과 Group 1과 Group 2에 속하는 N-MAb에 의해 확인된 부위와 서로 overlapping됨이 확인되었다. 이를 통해 aa109, aa70, 그리고 aa392 사이에 conformational 한 구조가 형성되어 하나의 커다란 중화항체 형성에 관여하는 antigenic site를 이루고 있는 것으로 생각된다. 또한 Padilla-Noriega *et al*<sup>16</sup>은 사람과 원숭이의 로타바이러스 VP4의 항원구조 분석에서 VP5\*에는 교차반응에 관련된 부위와 serotype과 strain에 특이적인 부위가 존재한다고 보고하였다. 교차반응에 관련된 부위로는 aa305, aa385, aa388, aa392, aa393, aa428, aa433, aa439, aa441, 그리고 aa458을 확인하였고 serotype에 특이적인 부위로는 aa385(P1A, P2), aa392(P1B), aa397(P2), 그리고 aa458(P1A)가 존재함을 밝혔다. 그리고 aa383은 사람 로타바이러스 RV-3 strain에 특이적인 부위로 보고하였다. 본 실험에서도 교차반응에 관련된 부위로 aa385와 aa392가 확인되었으며 serotype P2에 특이적인 부위로 aa641이 새롭게 밝혀졌는데 aa385와 aa392는 이전에 확인된 결과<sup>18</sup>와 같으며 escape mutant와 N-MAb 사이의 반응성 확인 시험결과 aa385와 aa395 사이의 conformational 한 구조를 확인할 수 있었다. 이 결과는 교차반응하는 serotype에 차이는 있으나 serotype P1A와 P2에 대해 교차반응을 보이는 N-MAb을 이용해 aa385와 aa392 부위를 확인한 Kobayashi *et al*<sup>18</sup>의 연구결과와 유사하다. 특히 본 연구에서 새로 확인된 부위인 aa641은 중화단크론항체 16D2에 의하여 인식되는 위치로 혈청학적인 분석에서 이 중화항체단크론항체는 병원성이 있는 사람 로타바이러스와는 반응을 하지 않았으나 병원성이 없는 사람 로타바이러스와는 낮은 수준이지만 반응을 하였다. 이는 VP4가 병원성과 관여하는 구조단백질인 사실을 미루어 볼 때 aa641 부위가 로타바이러스에서 병원성에 관련된 부위로 추정된다.

본 실험에서 escape mutant의 단일염기변이를 확인하기 위해 이용한 SSCP 법은 기준이 되는 DNA와 비교 대상이 되는 DNA를 PCR 법으로 증폭하여 전기영동한

후 gel 상에서의 이동정도를 비교함으로써 변이를 찾아내는 방법으로 사람의 DNA 변이를 검색하기 위해 응용되었던 방법이다<sup>27</sup>. 본 연구에서도 SSCP 분석결과를 염기서열분석을 통해 확인한 결과 SSCP 분석에서 확인된 단편에서 단일염기의 변이를 찾을 수 있었다. 따라서 SSCP 분석법은 escape mutant의 변이를 찾는 데 유용하게 이용될 수 있는 것이 확인되었다.

## 결론

돼지 로타바이러스 Gottfried strain의 구조단백질인 VP4에서 바이러스 중화에 관련된 항원부위를 규명하기 위하여 Gottfried strain의 VP4에 특이적으로 반응하는 8개의 중화단크론항체를 이용하여 연구를 수행하였다. 각각의 중화단크론항체와 G type과 P type이 서로 다른 사람 및 동물 로타바이러스와의 중화반응성을 조사하고 각각의 중화단크론항체에 저항성을 보이는 escape mutant를 작성하여 분석하였으며 escape mutant의 VP4 유전자 염기서열을 확인하여 parent virus인 Gottfried strain의 VP4 유전자의 염기서열과 비교하여 변화된 염기를 확인하였다.

연구 수행 결과 Gottfried strain의 VP4에는 적어도 중화에 관련된 4개의 항원부위(I, II, III, IV)가 존재하고 있는 것으로 확인되었다. 중화단크론항체 24B9, 23G10 그리고 26A2에 의하여 인지되는 항원부위(I)는 중화단크론항체 30H5, 32B3 그리고 29B3에 의해 인지되는 항원부위(II)와 분리되어 있으나 중화단크론항체 21A1에 의하여 인지되는 항원부위(III)와는 서로 중복되어 있는 것으로 추측된다. 하지만 중화단크론항체 16D2에 의해 인지되는 항원부위(IV)는 이들 항원부위와 서로 분리되어 있는 것으로 확인되었다.

## 참고문헌

- 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 NS53, VP6 and VP7 genes. *J Gen Virol*, 75:2205-2212, 1994.
- Burns JW, Chen D, Estes MK, *et al*. Biological and immunological characterization of a simian rotavirus SA11 variant with an altered genome segment 4. *Virology*, 169:427-435, 1989.
- Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol*, 105:123-184, 1983.
- Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, 53:410-449, 1989.

5. Kirkwood CD, Palombo EA. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology*, 236:258-265, 1997.
6. Lu W, Duhamel GE, Hoshino Y, *et al.* Characterization of the bovine group A rotavirus strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-Cody(NCDV-Cody). *J Clin Microbiol*, 33:990-994, 1995.
7. Rosen BI, Parwani AV, Gorziglia M, *et al.* 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.
8. Kapikian AZ, Cline WL, Greenberg HB, *et al.* Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay(IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immun*, 33:415-425, 1981.
9. Mattion NM, Cohen J, Estes MK. The rotavirus proteins. In Kapikian AZ, ed, *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 1st ed, Marcel Dekker, New York, 1994.
10. Pongsuwanna Y, Taniguchi K, Chiwakul M, *et al.* Serological and genomic characterization of porcine rotavirus in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 34:1050-1057, 1996.
11. Kapikian AZ, Chanock RM, Rotaviruses. In Field BN, Knipe DM *et al.* ed, *Virology*, 3rd ed, Raven press, New York:1657-1708, 1996.
12. Huang J, Wang L, Firth S, *et al.* Rotavirus VP7 epitope mapping using fragments of VP7 displayed on phages. *Vaccine*, 18:2257-2265, 2000.
13. Denisova E, Dowling W, Laomonica R, *et al.* Rotavirus capsid protein VP5\* permeabilizes membranes. *J Virol*, 73:3247-3153, 1998.
14. Dowling W, Denisova E, Laomonica R, *et al.* Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5\* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J Virol*, 74:6368-6376, 2000.
15. Mackow ER, Shaw RD, Matsui SM, *et al.* The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:645-649, 1988.
16. Padilla-Noriega L, Dunn SJ, López S, *et al.* Identification of two independent neutralization domain on the VP4 trypsin cleavage products VP5\* and VP8\* of human rotavirus ST3. *Virology*, 206:145-154, 1995.
17. Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch Virol*, 141:587-600, 1996.
18. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J Gen Virol*, 71:2615-2623, 1990.
19. Larralde G, Li BG, Kapikian AZ, *et al.* Serotype-specific epitope(s) present on the VP8\* subunit of rotavirus VP4 protein. *J Virol*, 65:3213-3218, 1991.
20. Larralde G, Gorziglia M. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J Virol*, 66:7438-7443, 1992.
21. Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 19:105-111, 1984.
22. Kang SY, Benfield DA, Gorziglia M, *et al.* Characterization of the neutralizing epitopes of VP7 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol*, 31:2291-2297, 1993.
23. Kang SY, Saif LJ, Miller KL. Reactivity of VP4-specific monoclonal antibodies to a serotype 4 porcine rotavirus with distinct serotypes of human(symptomatic and asymptomatic) and animal rotavirus. *J Clin Microbiol*, 27:2744-2750, 1989.
24. Taniguchi K, Hoshino Y, Nishikawa K, *et al.* Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J Virol*, 62:1870-1874, 1988.
25. Kirkwood C, Masendycz PJ, Coulson BS. Characterization and localization of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotavirus. *Virology*, 196:79-88, 1993.
26. Chowdhury K. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 19:2792-2795, 1991.
27. Orita M, Iwahana H, Kanazawa K, *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:2766-2770, 1989.