

잠복감염시의 해양버나바이러스의 세포내에서의 동태

정성주[†] · 오명주

여수대학교 수산생명의학과

Persistent Infection of Marine Birnavirus and its Status of Infection in Cells

Sung-Ju Jung[†] and Myung-Joo Oh

Department of Fish Pathology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

The objective of the study was to clarify the mechanism of persistent infection of marine birnavirus (MABV) in various nonpermissive cell lines. It was observed in CHSE-214, RTG-2 and RSBK-2 that the virus produced at high yield with typical cytopathic effect (CPE). On the contrary, the CPE was not produced in EPC, FHM and BF-2 cells. However amount of virus protein in both permissive and nonpermissive cell lines detected by ELISA was almost the same. Electron microscopy showed virions in permissive cells but not in nonpermissive cells. From the results, it is clear that virus protein and RNA were produced in nonpermissive cells as observed in permissive cells; however, assembly of the virus particles did not occur in nonpermissive cells.

Key words : Persistent infection, Marine birnavirus (MABV), Antigen expression, Virus replication

해양버나바이러스 (Marine birnavirus, MABV) 는, 방어의 바이러스성복수증바이러스 (Yellow-tail Ascites Virus, YAV), 바이러스성변형증바이러스 (Viral Deformilty Virus, VDV)등을 포함하는 해산양식어에 폐사를 일으키는 바이러스이다 (Nakajima *et al.*, 1993; Sorimachi and Hara, 1985). 또한 MABV는 패류 및 저질에서도 분리되고 있는 것으로 보아 숙주역이 넓고 환경 중에도 많이 존재하는 것으로 생각되고 있다 (Rivas *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1998).

버나바이러스는 연어과어류에 감염하는 전염성췌장괴사증바이러스(Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV)가 잘 알려져 있고, 분자생물학적레벨에서의 연구도 진행되어 있다. 본 바이러스는 2분절의 double strand RNA를 가지고 있으며, A분절은 VP2, NS 및 VP3를 순서대

로 coding 하고 있다 (Dobos and Roberts, 1993; Duncan *et al.*, 1987). VP2/NS영역은 가변구역으로 geno-grouping에 사용되고 있으며, 바이러스의 숙주역이 이 영역에 의해 결정된다는 보고도 있다 (Heppell *et al.*, 1993; Hosono *et al.*, 1996).

일반적으로 바이러스가 다른 숙주에 감염하는 경우, 그 숙주에 적응하도록 변이가 일어난다고 알려져 있다. 또한 *in vitro*에서도 감수성이 다른 배양세포에서 계대를 계속하면 변이가 일어날 가능성이 있다. Jung (1998)은 6종류의 어류주화세포 CHSE-214 (chinook salmon embryo), RTG-2 (rainbow trout gonad), RSBK-2 (red seabream kidney), EPC (epithelial papilloma of carp), FHM (fathead minnow epithelium) 및 BF-2 (bluegill fin) 에 방어유래의 MABV Y-6 (Kusuda *et al.*, 1993)를 감염시키면, EPC, FHM 및 BF-2

[†]Corresponding Author

에 있어서는 감염 40시간 후에도 CPE (세포병성효과, cytopathic effect)가 관찰되지 않았으며, MABV Y-6에 대해 감수성을 가지지 않고 잠복 감염이 일어난다고 보고하였다. 또한, 계대 5대째의 바이러스로 VP2/NS영역의 168bp의 염기 배열의 변이를 조사한 결과 1염기에 변이가 일어나 있기는 했으나 아미노산레벨에서는 변이가 없었다.

본 연구에서는 MABV에 대해 감수성이 다른 세포내에서 계대를 계속함으로써 일어나는 바이러스의 적응현상과 잠복감염의 메커니즘을 밝히는 것을 목적으로 고분자합성과 바이러스 증식을 분자레벨에서 조사하여 비교하였다. 이를 위하여 MABV Y-6를 6종류의 어류유래의 주화세포에 감염시켜 계대 10대째의 바이러스항원의 발현, 정량 및 전자현미경관찰에 의한 바이러스입자의 관찰을 행했다.

재료 및 방법

시험바이러스와 세포

바이러스는 방어유래의 MABV Y-6를 사용하였다. 바이러스는 한계희석법으로 3회 클로닝하여 RTG-2로 배양하여, 이것을 시작바이러스로 사용하였다. 어류유래의 CHSE-214, RTG-2, RSBK-2, EPC, FHM 및 BF-2세포는 25 cm²의 플라스크를 사용하여 20°C에서 배양하고 배지에는 10%의 소태아혈청을 첨가한 1% glutamin 함유 EMEM (Eagle's minimum essential medium, Nissui)를 사용하였다. 바이러스의 계대는 각 세포를 혈구계산판으로 계수한 후, m.o.i가 0.01이 되도록 바이러스액을 접종하였다. EPC, FHM 및 BF-2세포에 있어서는 바이러스의 역가가 10⁶TCID₅₀/ml 이하로 m.o.i를 0.01로 맞출 수 있을 만큼의 자손바이러스가 복제되지 않았으므로 감염 40시간 후에 배양상층액 1 ml를 새로운 배양세포에 접종하여 계대하였다. 회수한 바이러스액은 -80°C에서 보존하였다. 실험에는 계대 10대째를 사용하였으며, 10대째의 바이러스생산

량은 TCID₅₀법으로 측정하였다.

형광항체법에 의한 항원발현의 확인

바이러스항원의 발현은 형광항체법으로 확인했다. 24 well plate에 세포배양용 cell disk (Sumilon)을 넣어 그 위에 각종세포를 배양하였다. 세포가 monolayer가 된 후에 바이러스를 접종하였다. 40시간 후, cell disk를 새로운 24 well plate에 옮겨 에탄올을 가하여 세포를 고정하였다. PBS로 3회 세정한 후 5% skim milk 로 한시간 blocking 하였다. 그 후, MABV Y-6의 바이러스 입자에 대한 항체를 200배로 희석하여 37°C에서 한시간 반응시켰다. 이것을 PBS로 세정하여 200배 희석한 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-rabbit IgG (DaKo)를 가하여 차광하여 37°C에서 한시간 반응시켰다. PBS로 세정한 후에 cell disk를 glycerol로 커버글라스를 봉입하였다. 형광의 관찰은 FLUOPHOT (Nikon)으로 행했다. 음성대조로는 정상 토끼혈청과 바이러스에 감염되지 않은 세포를 사용하였다.

ELISA법에 의한 바이러스항원의 정량

바이러스항원의 양을 각 세포에서 비교하기 위하여 ELISA법을 사용하였다. 바이러스를 각종 배양세포에 감염시켜 40시간 후에 회수하여, 2번 동결과 해동 처리하여 얻어진 배양액을 항원으로 사용하였다. 음성대조로는 각각의 바이러스를 감염시키지 않은 정상세포를 사용하였다. ELISA plate에 항원의 4배 희석계열을 만들어 37°C에서 2시간 반응시켜 흡착시켰다. 그 후 5%의 skim milk로 30분간 blocking하여 PBS로 3회 세정하였다. 1차 항체로는 MABV Y-6 바이러스입자를 정제하여 제작한 토끼혈청을 500배 희석하여 사용하였으며 반응 후 PBS로 3회 세정하였다. 다음에 각 well에 2차 항체로서 5000배 희석한 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako)를 50 μ l를 넣어 37°C에서 1시간 배양했다. PBS로 세정한 후, peroxidase 반응기질액을 각 well에 100 μ l넣어 37°C에서 10분간 반

응시켰다. 1N H₂SO₄로 반응을 정지시킨 후, microtiter reader MPR A4i (Tosoh)로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 1차 항체로 MABV Y-6의 주요 capsid protein인 VP2에 대한 항체 (항 VP2항체)로 동일한 실험을 행했다. 그 후 단백질을 modified Bradford법 (Read and Northcote, 1981)으로 구하여, ELISA의 결과를 각 감염세포단백 1 mg당의 흡광도치를 계산하여 Duncan법에 의해 유의차 검정을 행했다.

전자현미경관찰

감염세포내의 완전입자의 바이러스의 관찰은 투과전자현미경으로 행했다. MABV Y-6에 감염된 각종 배양세포를 개량 Karnovsky 고정액으로 전고정하여 0.1 M phosphate buffer로 한시간 세정하였다. 계속하여 2% OsO₄로 2시간 후고정하였다. 그 후, 알코올 계열로 탈수하여 에폭시 레진으로 포매 하였다. 계속하여 울트라마이크로톰으로 초박절편을 만들어 초산우라닐과 구연산납으로 2중염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

각종 세포에서의 바이러스 생산량

각종 배양세포와 10대째의 바이러스생산량을 Table 1에 나타내었다. MABV Y-6를 감염시킨 40시간 후 CHSE-214(Fig. 1, A), RTG-2와 RSBK-2세포는 세포가 둥글게 변하고 세포용해

를 보이는 CPE가 관찰되었다. 그러나 EPC, FHM 및 BF(Fig. 1, B)에서는 세포막의 경계가 약간 뚜렷해지는 현상이 관찰되기는 했지만 CPE는 나타나지 않았다. 이들 세포에 대해서는 실험구와 동일한 셋트의 플라스크를 준비하여 10일간 경과를 관찰하였으나 CPE는 관찰되지 않았다.

바이러스항원의 발현

형광현미경으로 세포내의 바이러스특이 단백질을 검출한 결과 감수성세포인 CHSE-214, RTG-2 및 RSBK-2 에서는 세포질에서 강한 특이형광이 검출되었으며 (Fig. 1, C), 바이러스 비감수성세포인 EPC, FHM 및 BF-2에서도 형광이 관찰되었다 (Fig. 1, D).

바이러스항원의 정량

계대 10대째의 바이러스항원을 ELISA법으로 정량하여, 각 감염세포에 있어서 단백질 1 mg의 흡광도치를 구하여 비교했다 (Fig. 2). 유의차 검증의 결과 MABV Y-6 항원양은 RSBK-2에서는 다른 세포와 비교하여 항원량이 많고, FHM은 다른 세포와 비교하여 항원량이 적었다. CHSE-214, RTG-2, EPC 및 BF-2의 사이에는 유의차는 없었다. 또한, 주요 capsid 단백질인 VP2의 항원량에 있어서는 CHSE-214와 RSBK-2에서는 다른 세포와 비교하여 항원량이 많고 이들 사이에 유의차는 없었으나 그 이외의 RTG-2, EPC, FHM 및 BF-2와의 사이에는 유의차가 있었다.

Table 1. Cell lines and the virus titers in 10th passage

Cell line	Origin	Virus titer (pfu/ml)
CHSE-214	Chinook salmon embryo	7.7 × 10 ⁶
RTG-2	Rainbow trout gonad	7.4 × 10 ⁶
RSBK-2	Red sea bream kidney	8.9 × 10 ⁶
EPC	Epithelioma of carp	3.1 × 10 ²
FHM	Fathead minnow caudal peduncle tissue	3.3 × 10 ³
BF-2	Bluegill fin	1.8 × 10 ⁴

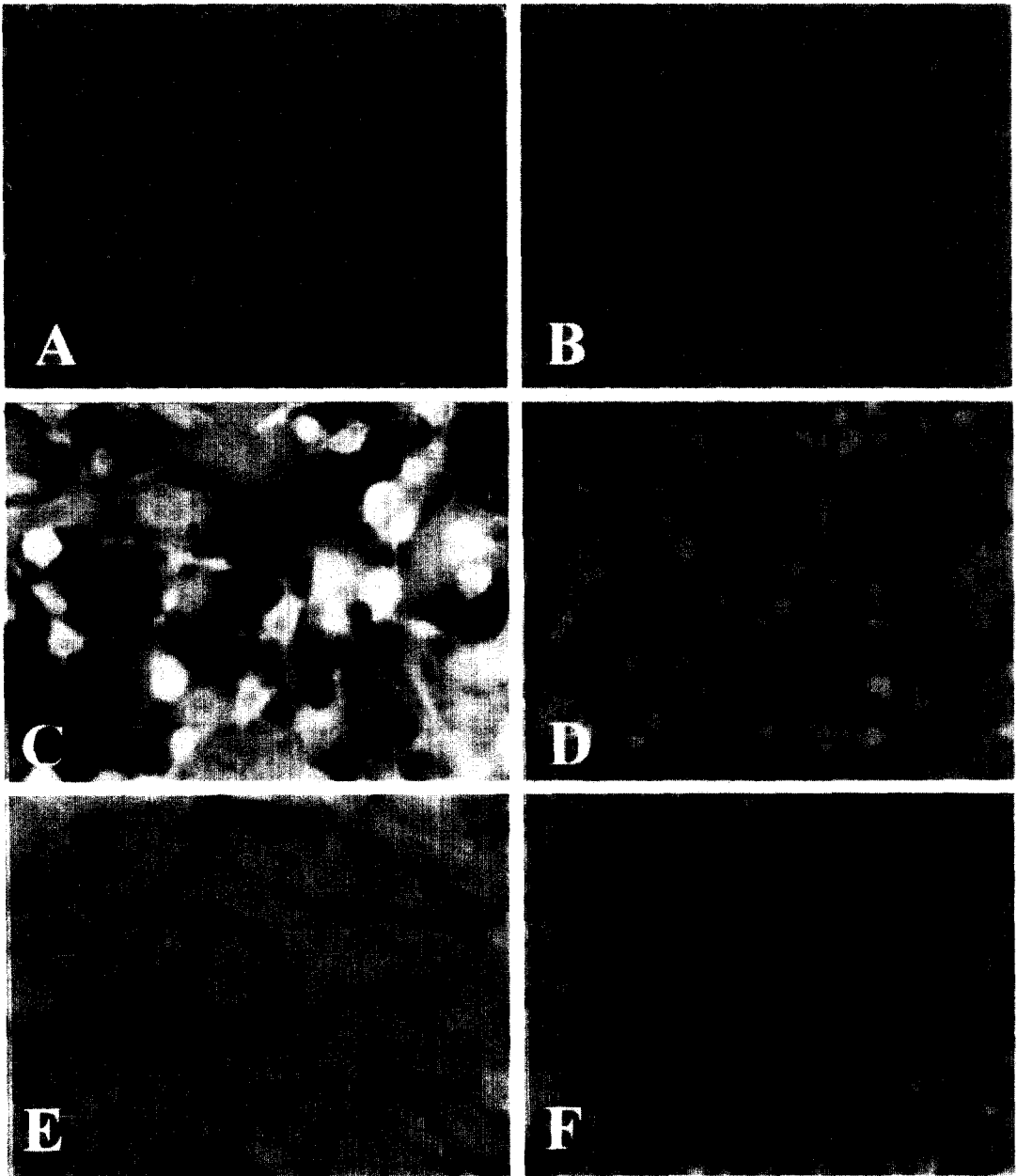


Fig. 1. Micrograph of CHSE-214 (A, C, E) and BF-2 (B, D, F) cells. A and B, MABV infected cells (light micrograph); C and D, MABV infected cells (immunofluorescent micrograph); E and F, Not infected cells (immunofluorescent micrograph). Magnification. $\times 100$.

감염세포내의 바이러스입자의 관찰

감염세포내의 성숙바이러스입자의 유무는 전자현미경으로 관찰했다 (Fig. 3). 감염성세포인 CHSE-214, RTG-2 및 RSBK-2에서는 세포질의

용해가 보이고, 성숙바이러스입자는 세포질에 존재하고 있다. 비감염성세포인 EPC, FHM 및 BF-2에서는 각 세포에 대해 200 메쉬의 그리드 위의 절편을 20 메쉬씩 관찰했지만, 바이러스입

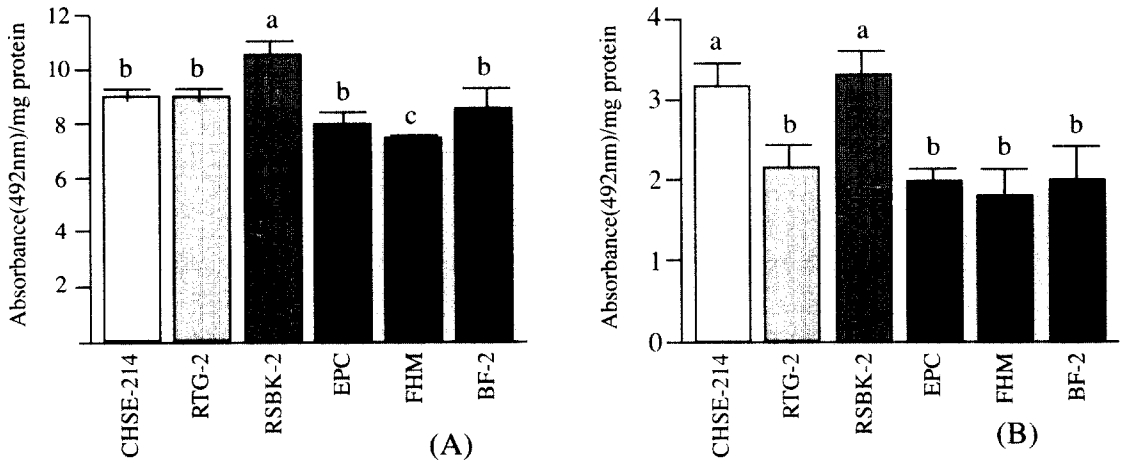


Fig. 2. Detection of virus antigen by ELISA. Antisera used for ELISA are anti-Y-6 virion serum(A) and anti-VP2 serum(B). ELISA titer was translated to absorbance/1mg protein. Alphabet is statistically different from each other.($p < 0.01$)

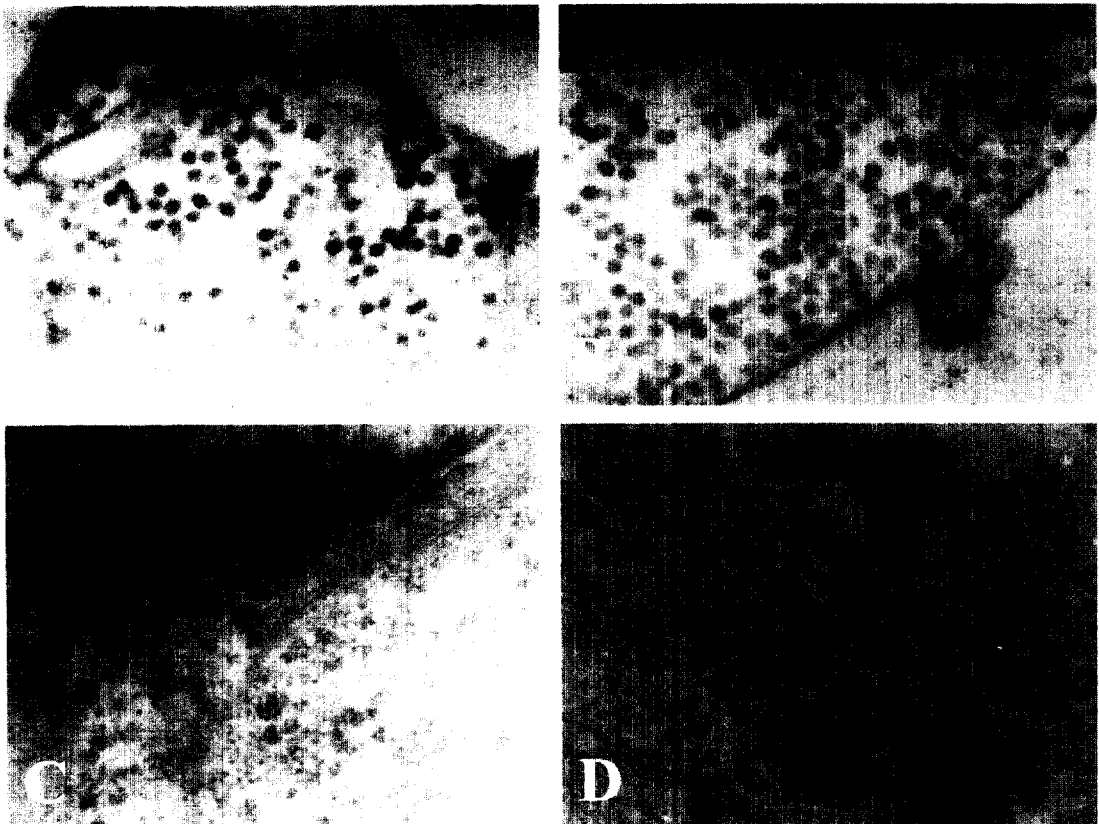


Fig. 3. Electron micrographs of infected cells. A, CHSE-214 cells; B, RTG-2 cells; C, FHM cells; D, BF-2 cells. Virion was not observed in C and D.

자는 관찰되지 않고 세포의 용해도 관찰되지 않았다.

고찰

MABV는 해산양식어에서는 다양한 질병의 원인이 되는 바이러스로, 어류를 비롯하여 패류에서도 분리되고 있으므로, 숙주역이 넓은 바이러스라고 생각되고 있다 (Rivas *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1998). 일반적으로 바이러스가 새로운 숙주에 감염하는 경우 그 숙주에 적응하려고 하는 변이가 일어나며 *in vitro*에서도 계대를 반복함에 따라 유전자변이가 일어난다고 생각되고 있다 (Hedrick and Fryer, 1981). MABV는 어류주화세포인 CHSE-214, RTG-2 및 RSBK-2에서는 바이러스복제가 일어나지만 EPC, FHM 및 BF-2에서는 잠복감염이 일어난다고 알려져 있다 (Jung, 1998). 그러나 지금까지의 연구에서는 감염세포내에서 어느 정도의 바이러스단백질이 발현되는가하는 정량적인 검토는 행하지 않았다. 본 연구에서는 감염성이 다른 6종류의 세포에 있어서의 MABV의 고분자합성과 증식과정을 분자레벨에서 조사함에 의하여 잠복감염기구를 밝히는 것을 목적으로 하여 MABV Y-6를 이용하여 CHSE-214, RTG-2, RSBK-2, EPC, FHM 및 BF-2의 6종류의 세포에서 10대 계대했을 때의 바이러스항원의 발현·정량, 바이러스입자의 관찰을 행했다.

각종 배양세포에 바이러스를 접종했더니, CHSE-214, RTG-2 및 RSBK-2에서 CPE가 나타났고 바이러스의 생산이 확인되었다. 이때의 바이러스항원의 발현을 형광항체법으로 조사한 결과, 감수성세포에서는 강한 형광이 세포질에서 확인되었다. 또한 CPE가 관찰되지 않았던 EPC, FHM 및 BF-2에 있어서도 형광이 확인되어, 세포내에서 바이러스의 단백질이 생산되고 있는 것을 나타내었다.

각종 감염세포내의 바이러스 항원량을 비교하기 위하여 계대 10대째의 바이러스항원을

ELISA법으로 정량하여, 단백질 1 mg당의 흡광치를 비교하였다. MABV Y-6의 바이러스항원량은 RSBK-2에서 다른 세포와 비교하여 항원량이 많고, 한편 FHM에서는 다른 세포와 비교하여 항원량이 적었다. CHSE-214, RTG-2, EPC 및 BF-2사이에서는 유의차는 없었다. 그러므로 감수성세포와 비감수성세포내의 바이러스 항원량에 큰 차이는 없다고 생각된다. 또한, 주요 capsid 단백질인 VP2 항원만을 검출하였더니, CHSE-214와 RSBK-2에서는 다른 세포와 비교하여 항원량이 많고 이들 간의 유의차는 없으나 그 이외의 세포와의 사이에는 유의차가 있었다. 그러나 감수성세포인 RTG-2와 비감수성세포인 EPC, FHM 및 BF-2와의 사이에는 유의차가 없으므로, 비감수성세포에 있어서는 감염성의 바이러스입자의 생산은 적으나, VP2는 감수성세포인 RTG-2와 같은 정도로 합성되고 있는 것을 알 수 있었다. RTG-2에서는 생산바이러스의 양은 많음에도 불구하고 바이러스단백량은 비감염성세포와 동일한 정도였으므로, 다른 세포에 비교하여 높은 효율로 바이러스가 세포 밖으로 유출된다고 생각된다.

각종 감염세포내의 바이러스입자를 전자현미경으로 관찰했더니, CHSE-214, RTG-2 및 RSBK-2에서는 바이러스입자가 관찰되었지만, 비감염성세포 3종류에 있어서는 바이러스입자는 관찰되지 않았다. Takeura *et al.* (1984) 는 인플루엔자 B 바이러스에 대해 비감염성인 마우스결합조직유래 L 세포를 이용하여, 바이러스증식과정을 조사하였다. 인플루엔자 B 바이러스는 바이러스단백질과 핵산이 결합한 후, 원형질막 하에서 출아할 때 완전한 바이러스입자가 되어 출아한다. 그들은 인플루엔자 B 바이러스는 바이러스단백질과 핵산의 결합까지의 단계는 진행되지만, 출아가 일어나는 단계에서 증식의 진행이 방해받는 것으로 고찰하고 있다. 본 연구에서 사용한 MABV는 세포질에서 바이러스단백질과 핵산이 조립되어 바이러스입자가 완성되므로, 비감염성세포내에서는 바이러스입자의

조립이 일어나지 않든지, 혹은 조립이 일어나더라도 양이 적음으로 인해 바이러스입자가 관찰되지 않았다고 생각된다.

Sorimachi and Hara (1985)는 방어유래의 YAV를 CHSE-214, RTG-2, EPC, FHM 및 뱀장어 신장 유래의 EK-1 세포에 접종하여 모든 세포에서 CPE가 관찰되었다고 보고하고 있다. 그러나 본 연구에서 사용한 EPC, FHM에서는 CPE가 관찰되지 않은 것으로 보아, 숙주세포 자체가 계대를 반복하는 사이에 변화했을 가능성도 생각된다.

이상으로부터, MABV의 비감염성세포내에서의 잠복감염은 증식과정의 초기단계에 까지 진행되고 있으나, 바이러스입자의 완성에는 이르지 않은 것이 밝혀졌다. 잠복감염을 일으키는 원인이 바이러스측이나 숙주세포측의 어느 한 쪽에 존재하고 있는지 혹은 둘의 상호작용에 의한 것인지를 밝히기 위한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

요약

본 연구는 해양버나바이러스 (Marine birnavirus, MABV)가 이 바이러스에 감수성이 약한 세포내에서 잠복감염을 일으키는 메카니즘을 밝히기 위해 행했다. MABV는 CHSE-214, RTG-2와 RSBK-2세포내에서 전형적인 세포변성효과 (CPE)를 나타내며 높은 역가를 나타내지만, EPC, FHM과 BF-2세포에서는 CPE가 나타나지 않았다. 항바이러스입자항체와 항VP2항체로 ELISA법에 의하여 발현된 바이러스단백질의 양을 측정된 결과 두 경우 모두에서 생성되는 바이러스의 항원의 양은 거의 같았다. 전자현미경 관찰에서 CHSE-214, RTG-2와 RSBK-2세포에서는 다수의 바이러스입자가 관찰되었으나 EPC, FHM과 BF-2세포에서는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터, MABV는 EPC, FHM과 BF-2세포와 같은 감수성이 약한 세포에 있어서는 바이러스입자의 조립은 이루어지지 않

으나, 높은 역가의 바이러스를 생산하는 CHSE-214, RTG-2와 RSBK-2세포와 같은 정도의 바이러스단백질이 발현되고 있으며 이러한 형태로 숙주내에서 잠복감염을 일으키는 것으로 생각된다.

사사

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었음 (KRF-99-041-H00008 H2004)

참고 문헌

- Chou, H-Y., Li, H-J. and Lo, C-F.: Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.*, 29: 171-175, 1994.
- Dobos, P. and Roberts, T.E.: The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Microbiol.*, 29: 377-384, 1993.
- Duncan, R., Nagy, E., Krell, P.J. and Dobos, P.: Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.*, 61: 3655-3664, 1987.
- Hedrick, R.K. and Fryer, J.L.: Persistent infections of three salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Pathol.*, 15: 163-172, 1982
- Heppell, J., Berthiaume, L., Corbin, F., Tarrab, E., Lecomte, J. and Arella, M. A.: Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virol.*, 195: 840-844, 1993.
- Hosono, N., Suzuki, S. and Kusuda, R.:

- Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish : a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A. *J. Fish Dis.*, 19: 298-302, 1996.
- Jung, S. J.: Change of infection properties of sub-cultured marine birnavirus in several fish cell lines. *J. Fish Pathol.*, 11: 89-96, 1998.
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. and Suzuki, S.: Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Fish Pathol.*, 28: 91-92, 1993.
- Takeura, S., Aoki, H., Tsurumi, T., Nishiyama, Y., Fujioka, H., Yosii, S. and Maeno, Y.: Abortive infection of L cells by influenza B virus: defect in bud formation. *Microbiol. Immunol.*, 28: 427-437, 1984.
- Nakajima, K., Maeno, Y., Arimoto, M., Inoue, K. and Sorimachi, M.: Viral deformity of yellowtail fingerlings. *Fish Pathol.*, 28: 125-129, 1993.
- Read, S. M. and Northcote, H.: Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 116: 53-64, 1981.
- Rivas, C., Cepeda, C., Dopazo, C.P., Novoa, B., Noya, M. and Barja, J.L.: Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture*, 115: 183-194, 1993.
- Sorimachi, M. and Hara, T.: Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from Yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.*, 19: 231-238, 1985.
- Suzuki, S., Nakata, T., Kamakura, M., Yoshimoto, M., Furukawa, Y., Yamasita, Y. and Kusuda, R.: Isolation of birnavirus from agemaki (jack knife clam) *Sionovacura constricta* and survey of the virus using PCR technique. *Fish. Sci.*, 63: 563-566, 1997.
- Suzuki, S., Kamakura, M. and Kusuda, R.: Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish. Sci.*, 64: 342-343, 1998.