

지속감염세포에서 분리된 일본뇌염바이러스 Plaque Morphology Mutants의 복제 및 감염특성

윤성욱 · 정용석*

경희대학교 생물학과 및 기초과학연구소

일본뇌염바이러스(*Japanese encephalitis virus*, JEV) Nakayama strain을 초기 multiplicity of infection 5.0으로 Vero 세포에 감염하여 1년 이상 안정적으로 바이러스를 방출하는 지속감염(persistently-infected) 세포주를 확립하였다. 지속감염 세포에서 지속적으로 방출되는 총 11 개의 plaque 형태 변이바이러스(morphology mutants) 클론을 확보하였다. 분리된 변이바이러스의 복제효율을 분석한 결과 생물학적 표현형과 복제효율은 유의하게 상관하였다. 변이바이러스 RNA 게놈 양 말단의 non-coding region 및 envelop 단백질의 ORF에서는 유의한 염기서열 변화가 관찰되지 않아 JEV 약독화에 새로운 인자가 추가로 관여할 가능성을 제시하였다. 변이바이러스에 감염된 신선한 Vero 세포는 wild-type JEV의 일반적 감염성상과 다르게 대다수의 세포가 유의할 만한 세포병변현상을 나타내지 않았다. 감염된 Vero 세포에서 wild-type JEV 및 large plaque을 형성하는 변이바이러스의 경우 mRNA와 함께 Bcl-2의 발현은 모두 유의하게 감소하였으며 p53은 뚜렷하게 증가하였다. 반면 small plaque을 형성하는 변이바이러스의 감염세포에서는 Bcl-2와 p53 모두 유의한 변화를 볼 수 없었다. 이상의 결과들과 함께, 감염된 Vero 세포의 internucleosomal DNA fragmentation과 DNA profile의 유형분석에 따르면 궁극적인 세포병변효과의 변화는 변이바이러스의 복제효율과 더불어 p53에 비의존적인 apoptosis 수위의 전반적인 감소에 기인하는 것으로 판단된다.

Key words □ apoptosis, persistent infection, plaque morphology mutants, RNA replication, *Japanese encephalitis virus*

일본뇌염바이러스(*Japanese encephalitis virus*, JEV)는 *Flaviviridae*과에 속하며 바이러스에 만성으로 감염된 모기에 의해 전파되어 높은 치사율과 영구적인 뇌손상을 일으키는 심각한 후유증을 동반하는 뇌염의 원인 병원체로서 아시아 국가를 물론 오세아니아 대륙에서도 심각한 보건 위생 문제가 되어 왔다(2,12,17).

JEV의 게놈은 약 11 kb에 달하는 단일나선의 positive-sense RNA로 구성되어 있으며 5' 끝에 type I cap을 포함하고 있으나 3' 쪽의 끝에는 poly(A) tail이 없고 10 kb가 넘는 단일 open reading frame(ORF)을 형성하고 있어 이로부터 하나의 polyprotein을 합성해 낸다(2,23). 이 polyprotein은 10 종 이상의 바이러스 단백질 단위들로 모습을 갖추게 된다(2,3,16). 구조단백질 capsid(C), precursor of membrane(prM), 및 envelop(E) 단백질 등은 바이러스 게놈의 5' 부위의 1/4 정도를 차지하고 있으며, RNA-dependent RNA polymerase를 포함하여 비구조단백질들인 NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, 및 NS5 등이 뒤이어 자리하고 이러한 배열은 모든 flavivirus에서 공통적으로 나타난다(6,15,23). 바이러스의 게놈 RNA가 세포질로 침투하면 먼저

바이러스 비구조단백질을 합성하며 helicase(NS3) 및 RNA-dependent RNA polymerase(NS5) 등이 RNA 게놈의 3' 말단 부위를 인지함으로써 negative-sense RNA 주형을 합성하게 된다(1,14). 585 염기로 구성된 JEV 게놈의 3' 말단과 polyprotein의 시작 부호 전까지 95 염기의 5' 말단은 polyprotein-coding ORF와는 독립된 'untranslated region (UTR)'으로 구분되며 바이러스 게놈 RNA의 복제기전에서 promoter 및 기타 잠재적인 조절인자로서의 매우 중요한 역할을 맡고 있는 cis-acting elements이다(1,2).

일반적으로 JEV는 감수성 세포에서 심각한 세포병변을 유발하며 병변유도의 주원인은 Bcl-2의 과발현으로 지연이 가능한 apoptosis로 보고된 바 있다(10,11). 그러나 JEV에 의한 지속감염은 Vero 등의 배양세포와 동물모델 모두에서 증명되었다(21,22). Sangster 등(19)은 특정 flavivirus에 저항성을 갖는 쥐를 통해 숙주의 유전적 배경에 따른 바이러스 질환 감수성 차이에 대해 보고한 바 있고, 사람 신경계의 JEV-associated encephalitis의 대략 5%가 바이러스 지속감염증과 관계 있을 것으로 보고 있다(18).

본 실험에서는 JEV 중에서 현재 국내에서 사백신을 생산하는데 사용되고 있는 strain Nakayama를 이용하여 plaque morphology mutant virus를 분리하고 이 mutant들의 복제 특성을 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-961-0829, Fax: 02-961-0244
E-mail: ysjeong@khu.ac.kr

재료 및 방법

세포 및 바이러스

본 실험에서 사용된 포유동물의 배양세포주로는 baby hamster kidney cells (BHK-21)과 African green monkey kidney cell (Vero)이며 5~10%의 fetal bovine serum(FBS) (Gibco, Gaithersburg, USA), penicillin, streptomycin (P/S) 및 L-glutamine이 첨가된 minimal essential medium (MEM) 또는 Medium 199 (M199)로 배양하였다. JEV는 국립보건원 신경계바이러스과에서 분주받았으며 국내 백신주인 Nakayama strain을 사용하였다. Nakayama wild-type 바이러스(reference stock)의 감염과 증폭을 위하여 BHK-21을 사용하였으며 지속감염의 확립 실험에서는 Vero 세포를 이용하였다. 각 세포주들은 0.5% CO₂ 공급과 함께 37°C에서 배양되었으며 세포 밖으로 방출된 바이러스 입자들은 접종 후(post-infection, p.i.) 72 시간에 배양액과 함께 수거하였으며 용혈된 세포의 잔류물을 원심분리 (2,000×g, 3 min)로 제거한 후 -80°C에 보관하였다.

Plaque assay

바이러스 titer 측정에는 35 mm 배양용기에서 배양된 confluent BHK-21 monolayer를 사용하여 agarose-overlay plaque assay를 수행하였다. 바이러스 접종 전 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어낸 후 바이러스를 접종하고 1% agarose, 5% FBS와 1% P/S로 보완된 30% 5×MEM을 재공급하였다. 이후 3~4 일간 동일 조건에서 배양하고 neutral red (Sigma, St. Louis, USA) 또는 0.1% crystal violet (Duksan Chemicals, Ansan, Korea)으로 염색한 다음 plaque의 수를 세고 titer를 결정하였다.

바이러스 plaque 클로닝

지속감염이 확립된 Vero 세포주에서 방출된 변이바이러스들을 plaque 형태에 따라 분류하고 plaque 클로닝을 수행하였다. 지속감염이 확립된 Vero 세포주의 배양상층액을 수거하여 BHK-21 confluent monolayer에 접종한 다음, plaque가 뚜렷하게 형성되면 micropipet tip으로 가볍게 바이러스를 문혀서 Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.4)에 재부유하였다. 이 HBSS 용액을 부유상태의 BHK-21 세포에 섞어 접종하고 24 시간 동안 배양한 다음 60 mm 배양용기의 신선한 confluent BHK-21 monolayer 위에 덧씌워 다시 72 시간 동안 혼합 배양하였다. 각 변이바이러스들은 3 차례에 걸쳐 재확인 클로닝하였으며 각 단계의 plaque 은 0.03% neutral red로 염색되었다.

감염세포내 total RNA의 분리와 정제

감염세포내 total RNA의 분리는 다음과 같이 수행하였다. 바이러스를 subconfluent cell monolayer에 접종하고 40 시간 배양한 후 배양상층액을 제거하고 4°C PBS로 3 차례 씻은 다음 RNA 추출용액(50 mM sodium acetate[pH 5.2], 0.6% SDS, 1 mM EDTA, 60 µg/ml proteinase K)을 가하였다. 상온에서 15 분 동안 방치되어 용혈된 세포액을 56°C에서 5~10 분간 배양한 후

phenol로 단백질을 제거하고 다시 상온에서 phenol/chloroform 혼합액으로 세포내 total RNA를 분리하여 100% ethanol로 침전하였다. 분리된 total RNA의 부유 용액은 다시 1 U RQ DNase (Promega, Madison, USA)를 처리하여 DNA를 제거한 다음 다시 phenol/chloroform과 100% ethanol을 사용하여 최종 정제하였다. 분리된 RNA는 UV-260 nm/280 nm에서 정량하여 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

Northern blot analysis

세포내 total RNA로부터 바이러스 RNA의 발현 양상을 확인하기 위해 18% formaldehyde (Sigma)를 함유한 1% denaturing agarose gel 상에서 전기영동하였다. 분리된 RNA는 Zeta-probe membrane (Bio-Rad, Richmond, USA) 상으로 옮겨져 UV-Cross linking (1200 J)으로 고정되었으며 JEV-특이 cDNA probe로 hybridization을 수행하였다. Probe로 사용된 cDNA를 합성하기 위하여 먼저 정제된 바이러스 게놈 RNA를 주형으로 NS5 ORF 말단부와 3'-UTR의 CS2 부위의 upstream에 걸쳐 random hexamer (Promega)와 AMV reverse transcriptase (Promega)를 이용, single-strand cDNA를 합성(37°C, 2 hr)하고, PCR을 이용, cDNA를 합성하였다. cDNA 단편은 pGEM-3Z (Promega)에 클로닝, 필요할 때 분리하여 hexamer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) random priming 방법으로 ³²P-dATP (10 mCi/ml, Amersham, Piscataway, USA)나 ³²P-dCTP (10 mCi/ml, Amersham)를 이용하여 방사능으로 표시하였다. RT-PCR을 위한 primer의 위치와 염기배열은 다음과 같다. Nakayama strain의 탐색을 위해서는 strain JaOArS982의 발표된 염기서열(24) 10276-10296 (5' ACA TCT Aga CGG CGA TAA ACC 3') Xba I을 sense primer로 하고 10803-10821 (5' CAC CTC CTC TgC AGC TTC G 3') Pst I을 antisense primer로 하여 strain JaOArS982와 상응한 부위를 증폭하도록 제작하였다. RT-PCR의 조건은 94°C에서 2분간 denaturation 후, 93°C에서 40초간 denaturation, 50°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension하는 증폭 조건을 30 회 반복하고 최종적으로 72°C에서 10분간 extension을 수행하도록 설정하였다. 모든 blotted membrane들은 0.25 M Na₂HPO₄ (pH 7.2), 7% SDS 용액 속에서 방사능이 표지된 probe와 반응시킨 다음(65°C, 16 hr), blot은 5% SDS로 조정된 40 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) 용액으로 65°C에서 각 30분간 2 차례 그리고 1% SDS로 조정된 40 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) 용액으로 65°C에서 각 30분간 2 차례 세척하였다. 감광에는 -80°C에서 intensifying screen과 함께 X-ray 필름(AGFA, Mortsel, Belgium)을 사용하였다.

bcl-2 mRNA의 RT-PCR

분리 정제된 감염세포내 total RNA는 UV에서 정량하였다. Total RNA 0.5 µg을 취하여 random hexamer (Promega)와 Superscript II reverse transcriptase (Gibco)를 이용, 37°C에서 2 시간 동안 cDNA를 합성하였다. 다음, bcl-2 유전자에 특이한 bcl-2R과 bcl-2L (Table 1)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence ^a	Position ^b	Usage
JE5'TRM(+)	5'-agaagttatctgtgtgaa-3'	1-19	PCR, sequencing
K5' 373(-)	5'-tcaatgagtggtcaaagt-3'	356-373	PCR, sequencing
EcoR I Pri(+)	5'-ctcatcggaattcgatccag-3'	10276-10296	PCR, sequencing
JE3'TRM(-)	5'-agatcctgtgttcttcctcacc-3'	10942-10963	PCR, sequencing
Primer1(+)	5'-acatctagacggcgataaac-3'	10276-10296	sequencing
Primer2(-)	5'-cacctcctctgcagcttcg-3'	10803-10821	sequencing
K3' 114(+)	5'-cagcatattgacacctgg-3'	10850-10867	sequencing
bcl-2R	5'-gctgcacctgagcccctca-3'		PCR
bcl-2L	5'-cttcagagacagccaggaga-3'		PCR

^{a,b}Sequence and nucleotide positions were referred to JEV strain JaOArS982(9).

PCR 조건은 94°C에서 2 분간 denaturation 후, 94°C에서 40 초간 denaturation, 60°C에서 1 분간 annealing, 72°C에서 40 초간 extension하는 증폭조건을 30 회 반복하고 최종적으로 72°C에서 10 분간 extension을 수행하였다.

바이러스 염기서열 분석

바이러스 RNA의 *cis*-acting elements 염기서열을 분석하기 위하여 5' 말단에 일치하는 primer (JE5'TRM, 1-19)를 sense primer로, C protein ORF 200 nt 이후 염기서열에 상보적인 primer (K5' 373, 356-373)를 antisense primer로 구성하고, NS5 ORF의 3'-proximal sequence에 일치하는 primer (EcoRI Pri, 10239-10258)를 sense primer로, 3' 말단에 상보적인 primer (JE3'TRM, 10939-10963)를 antisense primer로 구성하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR의 산물은 저온용융점 agarose gel 전기영동 후 용출하여 잔여 primer를 제거하였다. 염기서열결정은 0.1~0.5 µg의 PCR product, 5×DNA sequencing buffer (200 mM Tris-HCl [pH 9.0], 10 mM MgCl₂), 5 pM sequencing primer (Table 1)와 5 U *Taq* 중합효소(sequencing grade)를 첨가한 후 각각의 d/ddNTP Mix tube (G, A, T, C)에 나누어, 95°C에서 2 분간 denaturation 후, 95°C에서 30 초간 denaturation, 42°C에서 30 초간 annealing, 70°C에서 1 분간 extension하는 증폭조건을 45-60 회 반복하였다. 반응물은 6% polyacrylamide gel에서 전기영동(1700 V) 후, silver staining 방법에 의해 염기서열을 결정하였다.

Cell lysate preparation 및 Western blot

세포 monolayer (직경 100 mm 배양용기)을 차가운 PBS로 세척한 후, 500 µl의 RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1% NP 40, 10 mM deoxycholate, 0.1% SDS)와 protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate)를 첨가, 세포를 scraper로 모은 후 차가운 microtube로 옮겨 얼음에서 10 분간 반응시키고 총 세포 파쇄액은 원심분리(10,000×g, 10 min, 4°C) 후 상층액을 수거함으로써 얻었다.

총 세포 파쇄액의 단백질 정량은 spectrophotometer로 595 nm에서 Bradford method에 의해 수행하였다. 총 세포 파쇄액 30 µg을 6~12%의 SDS-polyacrylamide gel에서 1 시간 30 분 전기영동(30 mA) 후 PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (Immobilon-P, Millipore, USA)에서 300 mA, ∞ V로 4°C에서 3 시간 동안 이동시켰다. 다음, PVDF membrane을 blocking solution (5% nonfat milk-PBS)으로 상온에서 1 시간 blocking 후, 2% BSA-PBS solution에 희석한 1 차 항체(anti-BCL-2, BAX, AKT, p53, PI3K (p85α), ACTIN: 1/1000~1/2000)를 4°C에서 overnight 또는 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 과도한 1 차 항체를 TBST buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 제거하고, HRP (houseradish peroxidase)-conjugated 2 차 항체를 반응 시켰다. 최종적으로 membrane은 Chemilluminescence Luminol reagent (Amersham Pharmacia Biotech)와 상온에서 1 분간 반응시킨 후 X-ray film (AGPA)에 30 초~4 분간 감광하였다.

DNA fragmentation 분석

Low-molecular-weight DNA의 분리를 위해 배양용기의 바닥표면과 배양액에 부유하는 세포(10⁶~10⁷ cells)를 모두 모아 4°C PBS로 씻은 다음, 세포는 500 µl의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 1 µg/ml proteinase K)에 재부유하여 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 최종농도 1 M이 되게 NaCl을 첨가하고 4°C에서 16 시간 동안 배양하였다. 용해된 세포의 잔해는 15,000×g에서 30 분 동안 원심분리하여 제거하고 상층액은 phenol-chloroform 용액으로 단백질을 제거, DNA는 100% ethanol로 침전, 정제되었다. 침전된 DNA는 20 µg의 TE 용액에 녹여 10 µg/ml RNase A (37°C, 1 hr)와 반응시킨 후, 1.5% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

FACS analysis

바이러스 감염에 의한 DNA content 변화를 분석하기 위해 직경 10 mm 배양용기에 각각 1.0 multiplicity of infection (MOI)로 바이러스를 감염시킨 후 24, 48, 96 시간대 별로 비교, 분석

하였다. 세포는 차가운 PBS로 한 차례 세척한 후 1 ml의 1× trypsin-EDTA로 처리하여 9 ml의 배양액으로 부유한 다음, 2,000×g에서 5분 동안 세포를 침전시키고 다시 1×PBS로 세척하여 2,000×g에서 침전시켰다(5 min). 침전된 세포는 1 ml의 PBS에 재부유하고 세포핵은 최종농도 70%의 에탄올로 고정하였다 (4°C, 2~30 hr 또는 -20°C, 2 hr 이상). 고정이 끝난 세포는 위의 과정을 따라 다시 세척하고 1 ml의 PI (propidium iodide) solution (10 µg/ml PI, 250 µg/ml RNase A, Sigma)으로 염색(상온, 30 min)하여 flow cytometry로 분석하였다.

결 과

본 연구실에서는 confluent Vero 세포의 monolayer에 국내 일본뇌염바이러스의 백신주로 사용되고 있는 Nakayama strain을 감염(최초 MOI 5.0)하여 비희석 연속계대(undiluted serial passage)를 수행하였으며 실험과정 중 1년 이상 안정적으로 바이러스를 방출하는 지속감염 세포주를 확립한 바 있다. 지속감염이 확립된 Vero 세포주에서 방출된 변이바이러스들을 plaque의 형태에 따라 분류하고 plaque 클로닝을 통하여 11 개의 변이바이러스를 클로닝하였다(Fig. 1). Plaque 클로닝 과정을 3 차례 반복하는 동안에도 plaque의 형태 및 titer 등, 각 클론의 성질은 계속 유지되었다(Table 2). 또한 바이러스 클로닝 과정 중 defective interfering (DI) virus particle은 제거되었음을 확인할 수 있었다

Table 2. Phenotypes of JEV plaque morphology mutants

Clone Number	cloning II ^a		cloning III	
	diameter (mm) ^b	titer (pfu/ml)	diameter (mm)	titer (pfu/ml)
Cln1	1.0	4.3×10 ⁶	1.0	1.7×10 ⁶
Cln2	1.5	5.6×10 ⁶	1.5-2.0	3.5×10 ⁶
Cln3	2.5	4.2×10 ⁶	1.1-2.0	6.0×10 ⁶
Cln4	1.8-2.5	8.4×10 ⁶	2.5	3.7×10 ⁶
Cln5	1.5-2.0	2.4×10 ⁶	1.1-1.6	4.4×10 ⁶
Cln6	1.0	5.7×10 ⁶	1.0	7.3×10 ⁵
Cln7	1.5-2.0	4.4×10 ⁶	1.8-2.0	1.0×10 ⁷
Cln8	0.9-1.1	6.3×10 ⁶	0.9	4.3×10 ⁵
Cln9	1.0-2.1	3.6×10 ⁶	1.5-2.0	1.1×10 ⁶
Cln10	-	-	-	-
Cln11	1.2-1.5	4.0×10 ⁶	1.0	1.9×10 ⁶
Cln12	1.0-1.5	6.9×10 ⁴	1.0-1.2	3.6×10 ⁶

^aJEV mutants obtained from 15th serial passaged Vero cells that were persistently infected by the strain Nakayama. Plaque morphology mutants released from persistently infected and stabilized cells were plaque-cloned for three consecutive times and the characteristics of the clones from later two cloning stages are shown.

^bAverage plaque size of wild-type JEV Nakayama is 3~4 mm in diameter.

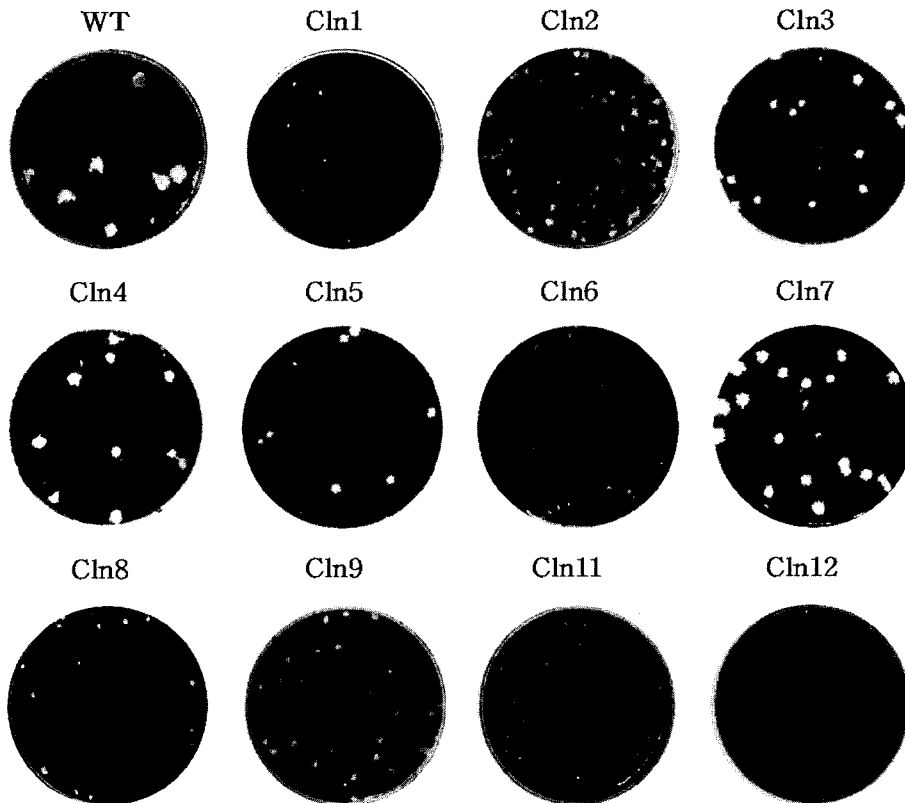


Fig. 1. Plaque morphology of parental wild-type and mutant JEV in BHK-21 cells. Monolayers of BHK-21 cells were infected with wild-type or mutant JEV, fed with medium containing 1% agarose and stained with crystal violet after 96 hr incubation. WT: wild-type JEV.

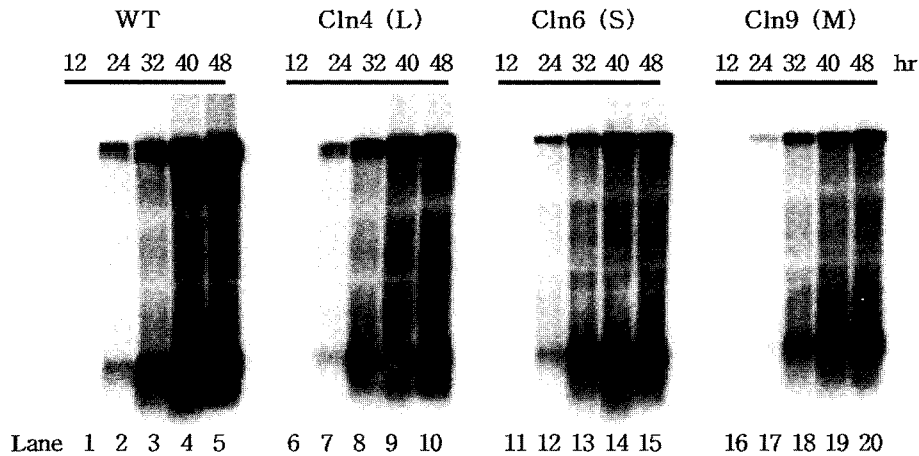


Fig. 2. Northern blot analysis of JEV-specific RNA accumulation following infection with cloned viruses isolated from persistently infected Vero cells. Naive Vero cells were infected with wild-type, Cln4 (large plaque-forming group), Cln6 (small plaque-forming group), Cln9 (medium plaque-forming group) at an MOI of 0.01. The cells were harvested at the indicated times (in hours) following infection and total intracellular RNA was prepared. RNA(3.12 $\mu\text{g/ml}$) was subjected to the analysis and probed with ^{32}P -dCTP labeled oligonucleotides (strain Nakayama nt 10276 to 10821) as described in Materials and Methods. WT: wild-type JEV.

(Fig. 2).

Plaque의 형태에 따라 분류된 변이바이러스의 그룹에 따라 복제효율 등의 표현형과의 일치성을 조사하기 위해 각 그룹마다 하나씩 클론을 선택하여 비교하였다. 신선한 Vero 세포에 각 변이바이러스 클론을 접종하고(0.01 MOI) 감염 후 12, 24, 32, 40, 48 시간대 별로 세포내 total RNA를 적출하여 Northern hybridization을 수행하였다(Fig. 2). Plaque 형태 변이바이러스는 wild-type 바이러스의 RNA 복제효율에 비해 현저히 저하된 것이 관찰되었다. 또한 각 그룹에 따른 표현형과 계놈의 복제효율은 일치하는 것으로 보여졌다(Table 2 및 Fig. 2). 각 클론마다 바이러스 RNA의 합성 시기는 조금씩 차이는 것으로 생각되며 lanes 1-5의 wild-type 바이러스와 비교한 결과 감염 후 12~24 시간 사이에서 변이바이러스의 RNA 적체 정도와 유사한 것으로 보아 바이러스 입자와 숙주세포의 흡착(adsorption) 효율에는 변화가 없는 것으로 판단되었다. 또한 감염 후 24~32 시간 사이의 시기에는 변이바이러스의 계놈 RNA 합성이 활발한 것으로 보여지나, 감염 후 40~48 시간 사이의 RNA 합성은 wild-type 바이러스에 비해 변이바이러스들에서 전반적으로 다소 저하된 것을 볼 수 있다(Fig. 2). 이 결과로 미루어 볼 때 UTR의 변이에 의한 전체적인 RNA 합성효율 저하 문제를 배제 할 수 없을 것으로 생각된다. 기존 JEV 연구에서 바이러스의 약독화 기전으로 계놈의 ORF 중 E 단백질의 138 번째 아미노산 치환이 유일하게 보고되어 있지만(4,25), 분리된 plaque 형태 변이바이러스에서는 유의한 차이를 볼 수 없었으며 다른 flavivirus를 포함한 RNA 바이러스의 경우 약독화 기전의 주요인이 UTR에 집중되어 있는 것으로 보고된 바 있다(1,8,9,14). 이 결과 변이바이러스의 계놈 RNA 합성에서도 생물학적 표현형과 복제효율이 상당히 일치하는 것으로 판단된다(Fig. 1과 2).

Plaque의 크기와 연관되었을 것으로 판단되는 바이러스 계놈 RNA 복제효율의 변화가 RNA cis-acting element의 변화에 의한

것인 지의 가능성을 조사하고자 5'-UTR, 3'-UTR과 3'-UTR의 conserved region I과 5'-3' cyclization sequence로 추정되고 있는 capsid gene의 N-terminal half에 걸쳐 PCR direct sequencing을 수행하였다. 5' 및 3' cis-acting element 모두 간헐적인 point mutation이 있을 뿐 이들의 복제효율 변화에 관여하는 염기서열의 변화는 볼 수 없었다(자료생략).

다음으로 11 개의 변이바이러스를 신선한 Vero 세포에 새로이 감염시킨 결과(0.1 MOI), 초기감염 직후 10~30% 내외의 세포병변효과를 보였을 뿐, 그 후 전형적인 만성감염된 세포주와 유사하였으며, 2 개월 이상 재접종 없이 지속적으로 바이러스를 방출되고 있는 것을 볼 수 있었다(자료생략). 이러한 사실로 미루어 볼 때 반드시 DI RNA 생성 여부와 관계 없이도 지속감염이 확립 될 가능성을 제시하는 것이라 할 수 있다. 바이러스가 지속감염을 확립하기 위한 작용기전 중의 하나는 DI RNA의 생성 여부와 관계없이 정상적인 바이러스 계놈의 일부 기능을 수정하는 형태이며 JEV 연구에서는 NS1 단백질 ORF에서 아미노산 잔기 치환 없이 NS1과 NS2A 단백질 사이의 비정상적인 절단 과정을 유도, 전반적인 바이러스 복제효율이 저하된 결과가 유일하게 보고된 바 있다(3).

변이바이러스에 의한 plaque size reduction과 세포 감염시 대다수의 세포 생존이 바이러스에 의해 유도되는 apoptotsis의 전반적인 감소에 의한 효과인지 확인하기 위해 변이바이러스가 감염된 Vero 세포의 DNA internucleosomal fragmentation 및 DNA profile을 조사하였다. DNA fragmentation의 비교를 위해 신선한 Vero 세포를 wild-type Nakayama strain과 plaque 형태 변이바이러스에 의해 감염시키고(1.0 MOI) 감염 후 24, 36, 40 시간대 별로 세포내 DNA를 적출하였다. Wild-type 바이러스 감염 후 36 시간부터 DNA laddering을 볼 수 있었으며(Fig. 3, lanes 5-7) 변이바이러스의 경우에는 large plaque을 형성하는 Cln7 감염세포에서만 감염 후 40 시간 시점에서 약간의 DNA laddering이

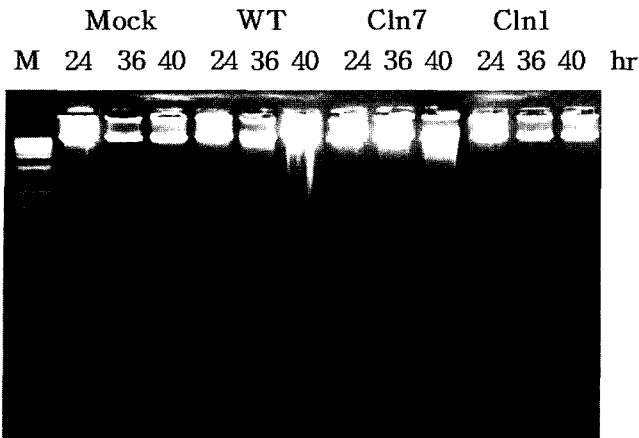
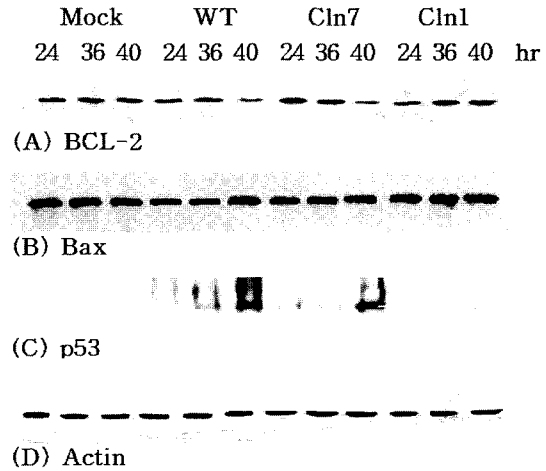


Fig. 3. Induction of apoptotic DNA fragmentation by wild-type or mutant JEV in Vero cells. Low-molecular-weight DNA was extracted from mock, wild-type, or mutants (Cln7 or Cln1) infected cultures at the indicated time points, electrophoresed on 1.8% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane 1, 1 kb ladder pulse marker; lanes 2-4, mock-infected cultures; lane 5-7, wild-type JEV-infected cells; lane 8-10, Cln7-infected cells; lane 11-13, Cln1-infected cells. WT; wild-type JEV.



(A) BCL-2
(B) Bax
(C) p53
(D) Actin
(E)

	Mock		WT		Cln7		Cln1			
	M	24	40	24	40	24	40	24	40	hr

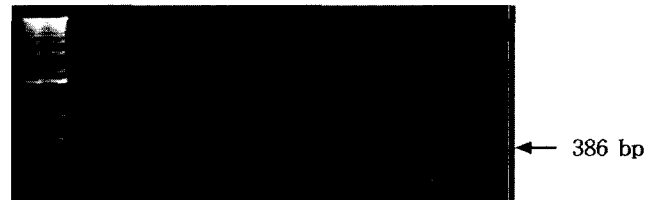


Fig. 5. Expression level of pro-apoptotic genes in JEV-infected Vero cells. Proteins were extracted from either the mock-infected or the JEV-infected Vero cells at 24, 36, 40 hr p.i. (as indicated on each lane) and analyzed by immunoblotting with the antibodies against Bcl-2, Bax, p53, or actin protein. (E) RT-PCR analysis of *bcl-2* mRNA. Total RNA isolated from mock, wild-type, or mutants (Cln7 or Cln1) infected cells at indicated time points, amplified by RT-PCR and electrophoresed on 1.5% agarose gel. WT: wild-type JEV.

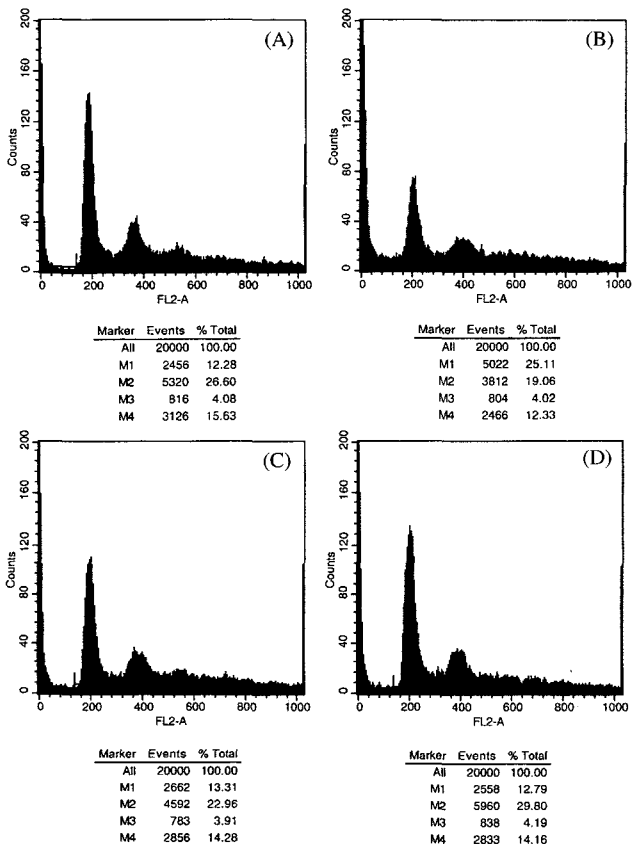


Fig. 4. Flow cytometry of Vero cells infected with JEV. Vero cells infected with 1 MOI of wild-type (B) or mutant (C) (Cln7) or (D) (Cln1) JEV and (A) control cells were taken at 40 hr p.i., fixed and stained with propidium iodide for FACS analysis.

관찰되었다(Fig. 3, lanes 8-10). 이와 달리 small plaque을 형성하는 Cln1 감염세포에서는 DNA laddering이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 3, lanes 2-4 및 11-13).

한편 바이러스의 감염에 따른 DNA profile을 분석하기 위해 신선한 Vero 세포에 1.0 MOI의 wild-type 바이러스와 변이바이러스를 각각 감염시키고 40 hr p.i.에서 PI staining 방법으로 관찰하였다(Fig. 4). Wild-type 바이러스 감염 후 sub-G0/G1 population (M1)은 25% 정도로서 감염되지 않은 대조세포에 비해 13% 정도 증가하였고 G0/G1 population (M2)은 19%로 대조세포에 비해 약 7% 정도 감소되었다(Fig. 4B). 그러나 plaque 형태 변이바이러스가 감염된 세포에서는 바이러스가 감염되지 않은 대조세포와 유의한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 4A, C 및 D). 이상의 결과에 근거하면 plaque 형태 변이바이러스가 나타내는 plaque size reduction의 이유는 바이러스 복제효율의 저하와 함께 JEV 감염세포에서 유도되는 apoptosis의 정도변화도 수반되는 것으로 판단된다. 또한, 만약 세포병변효과의 감소에 apoptosis가 관련되었다면 이는 바이러스 감염 후 특정시각을 기준으로 판단하여 apoptosis가 지연된 것으로 관찰되었을 가능성보다는 변이 바이러스에 의한 apoptosis의 유도특성 자체가 변화되었을 가능성이 높아 숙주세포의 apoptosis에 관여하는 JEV 단백질의 변화

가능성을 배제할 수 없는 것으로 판단된다.

표준바이러스나 변이바이러스 감염시 세포질 수준에서의 apoptosis의 유발과 저지의 현상을 비교 분석하기 위해 pro-apoptotic gene인 *bcl-2*, *bax*와 tumor suppressor factor인 p53의 발현 수준을 비교하였다(Fig. 5). 발현 수준의 비교를 위한 감염 세포의 적출물은 1 MOI로 감염된 후 24, 36, 40 hr p.i.에 준비하여 비교 분석하였다. Bcl-2는 wild-type 바이러스와 Cln7의 경우 36 시간 이후 감소하는 것으로 보였으나 비감염 대조세포와 Cln1의 경우에는 뚜렷한 변화를 보이지 않았다(Fig. 5A). 한편 Bax의 발현은 모든 경우에서 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 5B와 D). JEV 감염에 의해 Bcl-2는 특이적인 감소를 보인다고 제안할 수 있으며 이러한 감소가 전사단계에서 조절되는지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행, 간단한 양적 비교를 시도하였다. Total RNA는 wild-type 바이러스와 변이바이러스를 각각 1.0 MOI로 감염한 후 24, 40 hr p.i.에 분리하였다. *bcl-2*의 mRNA의 양도 앞선 Western blot 결과(Fig. 5A)와 마찬가지로 감소되었음을 볼 수 있었다(Fig. 5E). 또한 Bcl-2의 감소에 의한 apoptosis에 p53이 관여하는지의 여부를 확인하기 위해 anti-p53 antibody를 이용하여 immunoblot을 수행하였다. p53의 발현 수준은 Bcl-2의 감소를 보이고 있는 wild-type 바이러스와 Cln7 변이 바이러스의 경우에서 감염시간에 따라 증가하였으며(Fig. 5C) 이는 JEV에 감염된 숙주세포의 apoptosis 유도기전에 p53이 관여할 가능성을 상당부분 배제하는 결과로 판단된다.

고 찰

본 연구에서는 JEV에 지속감염된 Vero 세포에서 방출되는 plaque 형태 변이바이러스의 생물학적 및 유전학적 특성을 분석하였으며 이 변이바이러스에 의해 유발되는 숙주세포 병변효과의 변화를 조사하였다. Wild-type JEV와의 비교실험에서 plaque 형태 변이바이러스들은 상대적으로 저하된 RNA 게놈의 복제효율을 나타내었으며(Fig. 2), 이로 인한 바이러스 생산량의 감소는 plaque의 크기감소에 일차적인 이유가 될 것으로 생각된다. 바이러스 RNA의 복제효율에 직·간접적으로 관여하는 인자는 매우 다양할 것이나 그 중 가장 영향력 있는 인자 중 하나로서 선상 RNA 게놈의 양쪽 말단에 종종 위치하는 *cis*-acting element를 들지 않을 수 없다(1,2). 따라서 JEV 게놈 RNA의 *cis*-acting element의 변이 가능성을 확인하고자 5'-UTR, 3'-UTR과 3'-UTR의 conserved region I, 5'-3' cyclization sequence로 추정되고 있는 capsid gene의 N-terminal half에 걸쳐 PCR direct sequencing을 수행하였다. 5'- 및 3'-UTR에 존재하는 *cis*-acting element 후보염기서열 분석결과 모두 간헐적인 point mutation이 발견되었지만 이 정도의 변이들이 RNA 복제효율의 전반적인 변화의 이유라고 단정할 만한 근거는 없다(Fig. 3). Khromykh 등은(8) Kunjin 바이러스의 감염성 cDNA 클론에 다양한 결실변이를 도입하여 바이러스 RNA 게놈의 복제효율 변화를 점검하였다. 그 실험에서 바이러스 RNA의 감염성을 손상하지 않으면서 도입한 다양한 결실(deletion)의 형태는 3'-UTR에 한정되었지만 결실의

범위는 수십-수백 bases에 달하였다. JEV 약독화 strain 중 게놈의 조성이 가장 잘 조사된 SA14-14-2의 경우(16)를 비교한다면 분리된 plaque 형태 변이바이러스의 RNA 게놈 중 조사되지 않은 지역의 몇몇 point mutation들이 RNA 복제효율에 결정적인 영향을 미칠 가능성도 현재로서는 완전히 배제할 수 없다. 이와 같은 가능성의 경중을 판단하기 위해서는 JEV의 감염성 cDNA에 작위적 변이를 도입하고 그에 따른 복제효율이 비교되어야 할 것이나 JEV의 감염성 cDNA에 변이를 도입한 연구는 보고된 바 없다.

다른 한편으로, 비록 large plaque 변이바이러스의 RNA 게놈 복제효율이 small plaque 변이바이러스에 비해 다소 나아 보이지만 이 차이만으로 large plaque와 small plaque 사이의 차이를 설명하기에는 충분하지 않다고 판단되었다. JEV에 의한 세포병변효과의 주요인은 감염에 따른 apoptosis의 유발임이 보고되었으며(10,11) plaque의 형성이 세포용혈에 따른 것임을 고려하면 분리된 plaque 형태 변이바이러스의 plaque size reduction에 숙주세포의 apoptosis도 어느 정도 관여할 수밖에 없을 것이다. 실제로 plaque 형태 변이바이러스들에 감염된 세포들에서는 상당부분 apoptosis가 감소되고 있음을 확인하였다(Fig. 3과 4). 물론 DNA fragmentation의 비교관찰과 DNA profile 추적에 의한 세포주기변화를 비교하는 정도로 apoptosis의 변화를 완전히 분석해낼 수는 없지만 이 결과들은 plaque 형태 변이바이러스들을 신선한 Vero 세포에 감염시켜 즉시 지속감염의 양상을 유도한다는 기존의 관찰결과와 더불어 변이바이러스들의 세포병변효과 변화에 숙주세포의 apoptosis 변화가 수반되고 있음을 확인시켜주고 있다.

기존의 JEV 연구결과에 따르면 NS1 단백질의 ORF에서 아미노산 잔기의 치환 없이 NS1과 NS2A 단백질 사이의 비정상적인 절단 과정이 발생하여 전반적인 바이러스 복제효율이 저하된다는 주장이 있었으며(3), 또 E 단백질의 138번째 아미노산 치환에 의한 복제효율 감소가 유발된다는 보고도 있었다(4,25). 이번 연구의 plaque 형태 변이바이러스들이 신선한 Vero 세포에 감염되어도 세포병변을 거의 일으키지 않았던 결과와 함께 위 두 기존의 보고는 숙주세포보다는 바이러스 자체의 약독화가 유발되었을 가능성을 제시한다. 그러나 E ORF를 포함하여 이번에 분석된 염기서열 조사지역에서는 유의한 변화를 확인할 수 없었으며(자료생략) 따라서 제시된 지역이 아닌 이외의 인자가 JEV에 의한 apoptosis에 관여할 수 있음을 시사한다.

세포내의 apoptosis 관련 단백질 인자들 중 이번 연구에서는 Bcl-2, Bax, 그리고 p53 단백질의 발현변화를 관찰하였다. Wild-type JEV의 감염에 따른 Bax 발현수준의 변화는 볼 수 없었으나 Bcl-2와 *bcl-2* mRNA의 감소는 확연하게 나타났다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 기존의 Bcl-2가 과발현되는 세포의 JEV 감염 연구에서 Bcl-xL보다는 Bcl-2가 apoptosis를 지연시키는 중요한 요소로 작용할 것이라고 보고된 결과(10,11,20)와 일치하는 것으로 판단된다. JEV를 포함한 여러 바이러스들은 *bcl-2*의 과발현에 의해 apoptosis가 지연되지만 결국은 지속감염으로 가지 못하고 사멸하게 된다(3,10,15). 이는 앞서 말한 바와 같이 plaque 형태

변이바이러스의 plaque size reduction에 apoptosis 이외의 인자가 기여하고 있음을 다시 반증한다. 여기서 Bcl-2의 발현은 전사단계에서 조절되는 것으로 보이며, 한타바이러스의 경우 Bcl-2 발현은 전사후단계에서 조절된다고 보고된 바 있지만(15) 이 차이가 apoptosis의 조절에 어떠한 의미를 부여하는 지는 아직 알 수 없다. 세포의 유전체 이상을 인식하고 세포주기의 진전에 제동을 걸어 궁극적으로는 apoptosis의 방항제시에 큰 역할을 담당하는 p53은 wild-type이나 large plaque를 형성하는 변이바이러스에서 감염 후 뚜렷한 증가세를 보였다(Fig. 5C). 그러나 small plaque를 형성하는 변이바이러스의 감염에서는 p53의 변화는 전혀 없었으며(Fig. 5C) 이는 JEV에 의한 apoptosis의 유도에 p53이 관여하지 않을 가능성을 제시한다. 아직까지 p53이 관여하는 RNA 바이러스의 apoptosis 기전 연구는 Rubella virus 등 일부에서만 보고되어 있어(5,13) 이 분야에서의 p53의 역할은 다각도로 설명되어야 할 주제로 남아 있다.

이번 연구에서 JEV에 지속감염된 Vero 세포에서 분리한 plaque 형태 변이바이러스들의 게놈 염기서열변화 및 복제효율 등의 분자생물학적 특성과 숙주세포에서의 감염특성 규명연구는 일차적인 시도였다. 이 바이러스들의 표현특성과 유전형질을 관계 짓고 그 분자생물학적 기전을 규명하는 작업은 방대한 실험량과 연구기간을 필요로 하지만 진화적 소수로 규정되는 RNA 바이러스의 지속감염을 설명하고 나아가 그로 인한 만성질환의 예방과 치료에 기여할 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단의 신진교수과제 학술연구비(1999.3-2000.2)에 의하여 지원되었습니다.

참고문헌

- Cahour, A., A. Pletnev, M. Vazeille-Falcoz, L. Rosen, and C-J. Lai. 1995. Growth restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology* 207, 68-76.
- Chen, C-J., M-D. Kuo, L-J. Chien, S-L. Hsu, Y-M. Wang, and J-H. Lin. 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5 and 3' noncoding regions of *Japanese encephalitis virus* genomic RNA. *J. Virol.* 71, 3466-3473.
- Chen, L-K., C-L. Liao., C-G. Lin, S-C. Lai, C-I. Liu, S-H. Ma, Y-Y. Huang, and Y-L. Lin. 1996. Persistence of *Japanese encephalitis virus* is associated with abnormal expression of the nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 217, 220-229.
- Chen, L-K., Y-L. Lin., C-L. Liao., C-G. Lin., Y-L. Huang., C-T. Yeh., S-C. Jan, and C. Chin. 1996. Generation and characterization of organ-tropism mutants of *Japanese encephalitis virus in vivo* and *in vitro*. *Virology* 223, 79-88.
- Duncan, R., J. Muller, N. Lee, A. Esmaili, and H.L. Nakhasi. 1999. Rubella virus-induced apoptosis varies among cell lines and is modulated by Bcl-XL and caspase inhibitors. *Virology* 255, 117-128.
- Hasegawa, H., M. Yoshida, S. Fujita, and Y. Kobayashi. 1994. Comparison of structural proteins among antigenically different *Japanese encephalitis virus* strains. *Vaccine* 12, 841-844.
- Kang, J-I., S-H. Park, P-W. Lee, and B-Y. Ahn. 1999. Apoptosis is induced by hantaviruses in cultured cells. *Virology* 264, 99-105.
- Khromykh, A.A. and E.G. Westaway. 1994. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol.* 68, 4580-4588.
- Lai, C.J., R. Men, M. Pethel, and M. Bray. 1992. Infectious RNA transcribed from stably cloned dengue virus cDNA: construction of growth restricted dengue virus mutants. pp. 265-270. In H.S. Ginsburg, F. Brown, R.M. Chanock and R.A. Lerner (eds) *Vaccines 92. Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Liao, C-L., Y. Lin, J-J. Wang, Y-L. Huang, C-T. Yeh, S-H. Ma, and L-K. Chen. 1997. Effect of enforced expression of human *bcl-2* on *Japanese encephalitis virus*-induced apoptosis in cultured cells. *J. Virol.* 71, 5963-5971.
- Liao, C-L., Y-L. Lin, S-C. Shen, J-Y. Shen, H-L. Su, Y-L. Huang, S-H. Ma, Y-C. Sun, K-P. Chen, and L-K. Chen. 1998. Antiapoptotic but antiviral function of human *bcl-2* assists establishment of *Japanese encephalitis virus* persistence in cultured cells. *J. Virol.* 72, 9844-9854.
- Matsuura Y., M. Miyamoto, T. Sato, C. Morita, and K. Yasui. 1989. Characterization of *Japanese encephalitis virus* envelope protein expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* 173, 674-682.
- Megyeri, K., K. Berencsi, T.D. Halazonetis, G.C. Prendergast, G. Gri, S.A. Plotkin, G. Rovera, and E. Gonczol. 1999. Involvement of a p53-dependent pathway in Rubella virus-induced apoptosis. *Virology* 259, 74-84.
- Men, R., M. Bray, D. Clark, R.M. Chanock, and C-J. Lai. 1996. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity. *J. Virol.* 70, 3930-3937.
- Muyllaert, I.R., R. Galler, and C.M. Rice. 1997. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.* 71, 291-298.
- Nitayaphan, S., J.A. G-J.J. Chang, and D.W. Trent. 1990. Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of *Japanese encephalitis virus* and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2. *Virology* 177, 541-552.
- Poidinger, M., R.A. Hall, and J.S. Mackenzie. 1996. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 218, 417-421.
- Ravi, V., A.S. Desai, P.K. Shenoy, P. Satishchandra, A. Chandramuki, and M. Gourie-Devi. 1993. Persistence of *Japanese encephalitis virus* in the human nervous system. *J. Med. Virol.* 40, 326-329.
- Sangster, M.Y., D.B. Heliams, J.S. Mackenzie, and G.R. Shellam. 1993. Genetic studies of flavivirus resistance in inbred strains derived from wild mice: evidence for a new resistant allele at the flavivirus resistance locus (flv). *J. Virol.* 67, 340-347.
- Scallan, M.F., T.E. Allsopp, and J.K. Fazakerley. 1997. *bcl-2* acts early to restrict Semliki forest virus replication and delay virus-induced programmed cell death. *J. Virol.* 71, 1583-1590.
- Schmaljohn, C.S. and C.D. Blair. 1977. Persistent infection of cultured mammalian cells by *Japanese encephalitis virus*. *J. Virol.* 24,

- 580-589.
22. Schmaljohn, C.S. and C.D. Blair. 1979. Clonal analysis of mammalian cell cultures persistently infected with *Japanese encephalitis virus*. *J. Virol.* 31, 816-822.
23. Stark, C. and S.I.T. Kennedy. 1978. The generation and propagation of defective-interfering particles of Semliki forest virus in different cell types. *Virology* 89, 285-299.
24. Sumiyoshi, H., C. Mori, I. Fuke, K. Morita, S. Kuhara, J. Kondou, Y. Kikuchi, H. Nagamatu, and A. Igarashi. 1987. Complete nucleotide sequence of the *Japanese encephalitis virus* genome RNA. *Virology*. 161, 497-510.
25. Sumiyoshi, H., G.H. Tignor, and R.E. Hope. 1995. Characterization of a highly attenuated *Japanese encephalitis virus* generated from molecularly cloned cDNA. *J. Infect. Dis.* 171, 1144-1151.

(Received August 12, 2002/September 9, 2002)

ABSTRACT: Replication and Pathogenesis of Plaque Morphology Mutants Derived from Vero Cells with *Japanese Encephalitis Virus* Persistence

Sung Wook Yoon and Yong Seok Jeong (Department of Biology and Research Institute of Basic Sciences, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea)

Japanese encephalitis virus (JEV) persistence was established and maintained in Vero cell culture for over 1 year. Eleven clones of plaque morphology mutant JEV, with large and small plaque sizes, were obtained from the cell culture supernatant. Genomic RNA replication efficiency of the mutants in naive Vero cell appeared to correspond to their different plaque sizes. No significant changes in envelop protein ORF or in non-coding regions at both ends of the RNA genome suggested that there could be an unidentified factor(s) playing role in JEV attenuation. Unlike to the replication of wild-type JEV, the mutants did not induce severe degree of cytopathic effect in Vero cells upon infection. While obvious decrease of Bcl-2 and its mRNA expression and sharp increase of p53 in naive Vero cells infected with either wild-type JEV or the large plaque-forming mutant, those changes were not observed with the small plaque-forming one. Together with these observation, internucleosomal DNA fragmentation and chromosomal DNA profile in the Vero cells infected with the mutants suggest that an overall changes in cytopathic effect in the plaque morphology mutants-infected cells should be primarily due to the reduced genomic RNA replication and the compromised degree of p53-independent apoptosis by the virus infection at least in part.