

해산어 종묘 생산 시기에 발생하는 바이러스성 신경괴사증 (VNN) 원인바이러스의 유전학적 비교

김석렬 · 정성주 · 김영진 · 김진도* · 정태성** · 최태진*** · 吉水 守**** · 오명주[†]
여수대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 여수수산 종묘시험장, **경상대학교 수의학과
부경대학교 미생물학과, *北海道大學 應用生物科學講座

Phylogenetic Comparison of Viral Nervous Necrosis (VNN) Viruses Occurring Seed Production Period

Suk-Ryol KIM, Sung-Ju JUNG, Young-Jin KIM, Jin-Do KIM*, Tae-Sung JUNG**
Tae-Jin CHOI***, Mamoru YOSHIMIZU****, Myung-Joo OH[†]

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

*National Fisheries Research & Development Institute, Yosu 556-906, Korea

**Lab of Fish & Shellfish Disease, College of Veterinary, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

***Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

****Division of Marine Bioscience, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

This study was performed both to explore the host of nervous necrosis virus (NNV) between mariculturing fish species and to examine the phylogenetic position of the NNV in Korea. NNV was confirmed on the basis of histopathological and molecular biological examination, then VNN infection was proved from either moribund or dead fishes including red drum, *Sciaenops ocellatus*; oblong rock fish, *Sebastes oblongus* and flounder, *Paralichthys olivaceus*. As a result of sequencing for a part of NNVs, virus from red drum was showed 98%, 97%, 86% and 74% homology with oblong rock fish, grouper, Japanese flounder and striped jack, respectively. On the other hand, NNV from oblong rock fish was demonstrated 96%, 85% and 72% homology with grouper, Japanese flounder and striped jack, respectively. NNV from red drum and oblong rock fish was exhibited phylogenically distant from the representative NNV, SJNNV originated from striped jack. On the contrary, the viruses appeared to be similar species with Taiwan NNV isolated from culturing grouper.

Key words: Phylogenetic comparison, Viral nervous necrosis, VNN, NNV, Red drum, Oblong rock fish, Flounder, Hatchery

서론

어류의 nodavirus는 바이러스성 뇌질환 및 망막질환 (viral encephalopathy and retinopathy, VER)과 바이러스성 신경괴사증 (viral nervous necrosis, VNN)의 원인체로 알려져 있고, 특히 자어나 치어 단계의 양식어류에서 대량 폐사를 일으킨다 (Munday and Nakai, 1997). 또한 이 바이러스는 친어로부터 난 및 자어로 이어지는 수직감염이 확인되어져 있다 (Nishizawa et al., 1997; Watanabe et al., 2000).

Nervous necrosis virus (NNV)는 Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*; striped jack, *Pseudocaranx dentex*; sevenbanded grouper, *Epinephelus septemfasciatus*; humpback grouper, *Cromileptes altivelis*; Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*; shy drum, *Umbrina cirrosa*; turbot, *Scophthalmus maximus*; Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*; red drum, *Sciaenops ocellatus* 등 다양한 해산어를 숙주로 하고 있으며, 지구상의 다양한 해역에 분포되어 있음이 보고되어 있다 (Watanabe et al., 2000; Zafaran et al., 2000; Bovo et al., 1999; Pavoletti et al., 1998; Tanaka et al., 1998; Fukuda et al., 1996; Nishizawa et al., 1994).

Nishizawa et al. (1997)은 20 strain 이상의 어류 유래 nodavirus의 capsid protein를 비교하여 striped jack NNV, barfin flounder NNV, redspotted grouper NNV 및 tiger puffer NNV 등 4가지 type으로 구분할 것을 제안하였으며, Thiery et al. (1999)은 서로 다른 지역에서 양식된 어류에서 병리학적으로는 같은 증상을 보였지만, 기존의 PCR 분석으로는 한 지역의 샘플에서만 VNN이 검출되어지는데 반해 다른 지역의 어류에서는 검출되지 않는 것에서 착안하여 새로운 primer를 제작하여 검출법을 확립하는 등 다양한 NNV의 변이종에 대하여 보고하고 있다.

국내에서는 현재 능성어, *Epinephelus septemfasciatus* 및 홍민어, *Sciaenops ocellatus*에서의 발생이 보고되어 있는 (Sohn et al., 1998; Kim et al., 2001) 정도로서 양식생물 종류별 숙주범위나 바이러스의 유전학적 위치 등에 대한 정보가 없는 실정이다. 본 연구는 국내 양식어종 중에 NNV의 숙주로서 작용하고 있는 어종을 PCR법으로 검색하고, PCR product를 유전학적으로 분석하여 국내에서 발생하고 있는 NNV의 유전학적 위치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

병어 채집 및 샘플처리

실험에 사용한 시료는 넙치, *Paralichthys olivaceus* (전남 영광,

*Corresponding author: ohmj@yosu.ac.kr

2000년 4월), 황점볼락, *Sebastes oblongus* (전남 여수, 2001년 4월) 및 홍민어, *Sciaenops ocellatus* (전남 여수, 1999년 10월) 치어로 모두 폐사 및 빈사상태의 어체를 각 지역에서 채집 후 실험실로 옮겨 바이러스 검사를 위해 whole body를 HBSS와 1:9로 희석 후 homogenizer를 이용하여 균질화하고, 5,000 rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 취해 0.45 μ m membrane filter (Satorius co.)를 사용하여 여과 후 -80°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

병리조직학적 관찰

병리조직학적 관찰을 위해 10% 중성 포르말린에 고정 후 탈수, 포매, 박절 및 H-E 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

RT-PCR

RNA isolation kit (Roche. Co)를 이용하여 바이러스 시료로부터 분리한 RNA는 70°C 에서 10분간 처리한 후 즉시 얼음 위에서 냉각시키고, 여기에 oligo (dT)15 primer와 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 units reverse transcriptase가 포함된 reverse transcription mixture (GibcoBRL Co.)를 첨가하여 총 20 μ L로 준비하였다. 역전사 반응은 42°C 에서 50분간 실시하였고 70°C 에서 15분간 처리하여 잔존 효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다. PCR 증폭반응을 위해 먼저 Nishizawa et al. (1994)이 제시한 SJNNV의 부분 RNA 서열을 기초로 디자인된 2 set의 primer를 준비하였으며, 100 pM의 각 primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 주형 cDNA 1 μ L를 첨가한 PCR reaction mixture를 GeneAmp 2400 (Perkin Elmer Co.)에 넣어 95°C 에서 1분, 58°C 에서 1분, 그리고 72°C 에서 1분간 30 cycle을 반복하는 조건으로 증폭시켰다. 증폭된 PCR product들은 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

Sequencing

Gel purification kit (Bioneer Co.)를 이용하여 gel로부터 회수한 PCR product에 대해 Dye Terminator Cyclic Sequencing Reaction과 ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Co.)을 이용하여 염기서열을 분석하였는데, 그 과정은 다음과 같다. 우선 Terminator Ready Reaction mix 8 μ L와 template 90 ng, 그리고 primer 3.2 pmol이 포함된 sequencing reaction mixture를 GeneAmp 2400

(Perkin Elmer Co.)을 이용하여 96°C 에서 10초, 50°C 에서 5초 그리고 60°C 에서 4분간 25 cycle을 반복하는 조건으로 반응시켰다. 반응액은 ethanol 침전을 시킨 다음 다시 template suppression reagent 25 μ L로 녹여서 ABI 310 Genetic Analyzer로 분석하였다. 얻어진 염기서열은 Blast 2 (NCBI)를 이용하여 Genbank에 등재된 NNV 염기서열과 비교하여 homology를 확인하였다.

결 과

영광 및 여수 일대에서 채집된 홍민어, 황점볼락 및 넙치들은 척추만곡, 체색흑화, 이상유영 등을 보였고, 질병 발생온도는 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 전후였다. 감염어체의 크기는 2 cm 이하의 치어에서 발생하였으며, 특히 증상을 보이지 않은 일부 개체들도 폐사되는 양상을 나타내었다 (Table 1). 이들 병어의 해부 관찰을 통하여 뇌출혈이 확인되었으며, 3종류와 서로 다른 어종을 대상으로 행한 병리조직적 관찰을 통하여 폐사한 개체는 대뇌, 소뇌, 연수 및 뇌실 주변부에서 현저한 공포화 및 괴사가 관찰되었고, 안구의 망막과 척수에서도 공포화 및 괴사되어진 세포를 관찰할 수 있었다.

폐사 및 빈사개체의 마쇄여과액으로부터 분리된 RNA를 대상으로 NNV검출을 위한 RT-PCR을 수행한 결과, 약 400 bp 위치에서 홍민어, 황점볼락 및 넙치에서 모두 약간의 차이가 있기는 하지만 PCR product를 확인할 수 있었으며 (Fig. 1), 이들 PCR product에 대한 염기서열을 확인하기 위해 sequencing을 실시한 결과에서 홍민어와 황점볼락에서 분리된 PCR product로부터 각각 400 bp와 352 bp까지 해독되었다. 이들을 Genbank에 등재되어있는 SJNNV의 coat protein 영역과 비교한 결과, 74%와 72%의 homology를 나타내었고 Japanese flounder로부터 분리된 JFNNV와는 각각 86%, 85%의 homology를 나타내었다. 그러나 grouper에서 분리된 NNV와의 비교에서는 각각 96%와 98%의 높은 homology를 나타내는 것으로 보아 국내에서 발견되는 NNV들은 striped jack 유래의 SJNNV가 아닌 grouper NNV와 같은 계통일 것으로 판단되었다 (Table 2, Fig. 2).

고 찰

여수와 영광에서 채집된 샘플들은 척추만곡, 체색흑화 등과 같은 전형적인 VNN의 외부증상을 보였으며, 최초 발생 이후 수일

Table 1. Comparison of infected fish by size, cumulative mortality, result of RT-PCR, clinical sign, environmental condition

| Fish | Size | Cumulative mortality (%) | Result of RT-PCR | Clinical sign | Water temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Date of occurrence |
|------------------|------------|--------------------------|------------------|---|------------------------------------|--------------------|
| Red drum | 1.5~1.8 cm | >90 | positive | dark coloration spinal swimming vertebral deformity | 25 ± 1 | Oct. 1999 |
| Oblong rock fish | 1~1.2 cm | 70~80 | positive | anorexia | 23 ± 1 | Apr. 2001 |
| Flounder | 1.8~2 cm | >70 | positive | dark coloration spinal swimming | 23 ± 1 | Apr. 2000 |

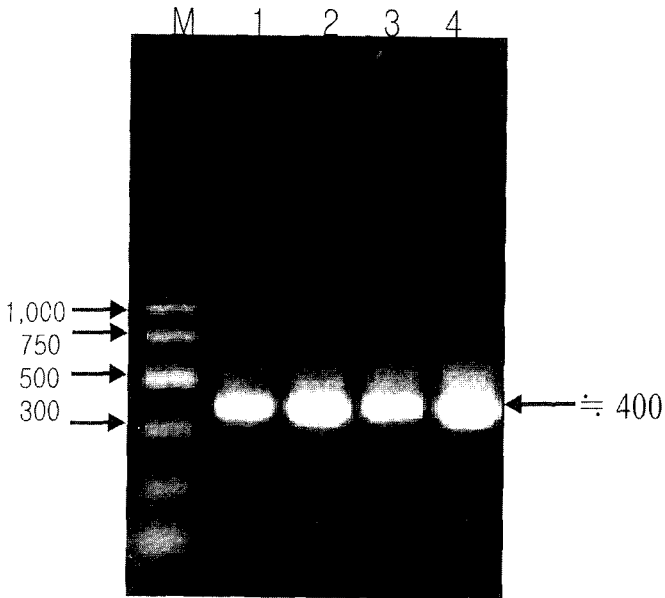


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplification products from diseased fish with the causative virus using primer based on coat protein gene of SJNNV. (Lane M, marker; 1, positive control; 2, red drum; 3, oblong rock fish; 4, Japanese flounder).

내에 70% 이상의 폐사를 나타낼 정도로 대량 폐사되어지는 양상을 나타내었다. 병리 조직학적 관찰에서도 VNN의 특이증상으로 알려져 있는 공포와 괴사조직을 확인하여, 이 지역 일대에서 발생한 3종류의 어류 종묘생산장의 폐사는 어류 nodavirus의 감염에 의하여 발생되어지는 것으로서 VNN 임이 판명되어졌다. NNV의 검출을 위해 사용한 primer는 Nishizawa et al. (1994)이 SJNNV를 검출하기 위해 제작한 primer set로서, SJNNV의 RNA2 fragment의 coat protein 영역을 증폭시키는 것으로 예상되는 산물의 크기는 426 bp였으나, 본 연구에서 확인된 PCR product는 426 bp 보다 작은 400 bp 정도로서 약간의 차이가 있었는데 (Fig. 2) 이는 SJNNV이외의 타 어종 유래의 NNV에서도 같은 결과를 확인할 수 있었다. 한편 각 염기서열들에 대한 homology 비교과정에서 가장 특이한 점은 Nishizawa et al. (1994)이 보고한 SJNNV coat protein region의 염기서열과 본 연구에서 확인된 홍민어와 황점볼락에서 분리된 NNV와의 비교에서 74% 이하의 낮은 homology가 나온 것은 국내에서 발견되는 NNV가 일본의 striped jack에서 유

래된 어류 nodavirus인 SJNNV와는 유전학적인 거리가 있음을 확인할 수 있는 결과였으며, 본 연구에서 확인된 NNV를 Nishizawa et al. (1997)이 보고한 4 type으로 구분한다면 grouper 등의 어류에서 유래된 redspotted grouper type에 속함을 알 수 있었다. 이는 Thiery et al. (1999)이 대서양과 지중해에서 동일어종인 European sea bass에서 검출한 nodavirus가 형태학적이거나 병리조직학적인 측면에서 매우 유사하지만, 원인체의 염기서열상에서 상이한 변이종의 발생으로 Nishizawa et al. (1994)의 primer를 이용하여 검출이 가능하지 못했던 경우의 보고와 함께 검토한다면, 국내에서 발생하는 어류 nodavirus도 Nishizawa et al. (1994)이 보고한 primer로 검출이 가능하지 못한 변이종이 분포하고 있을 수도 있음을 배제할 수 없다. Sohn et al. (1998)은 국내 남해안 일대에서 대량폐사한 능성어로부터 PCR법을 적용하여 폐사의 원인이 nodavirus의 감염에 의한 것이었음을 보고하고 그 NNV는 SJNNV와 유사하다고 보고한 바 있는데, 본 연구의 결과 그와 다른 계통의 NNV가 확인되었던 점에서, 이번에 검출된 어류 nodavirus들이 기존의 국내 연안 수계에 상존하는 바이러스로부터 변이에 의하여 달리 검출되어진 것인지, 또는 최근에 빈발하고 있는 외국산 활어류의 수입 등으로 기인하여 그러한 생물과 같이 유입되어진 것인지 하는 점에 대해서는 보다 구체적으로 확인해 볼 필요가 있는 것으로 생각되어진다. 그러나 본 연구에서 사용된 홍민어가 1990년대 말 양식어종의 다품종화라는 취지로 대만으로부터 수입된 어종이고, 대만에서 보고된 grouper NNV와 97% 가까운 핵산의 유사성을 보인다는 점에서 볼 때 토착성의 종이라고 생각되어지기 보다는 수입 등과 같은 경로를 이용하여 유입되어질수 있었음을 간과할 수 없는 사항이다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 선도연구사업 (KRF-99-041-H000 07)의 지원으로 행하여졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

Bovo, G., T. Nishizawa, C. Maltese, F. Borghesan, F. Mutinelli, F. Montesi and S. De Mas. 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Res.*, 63, 143-146.

Table 2. Cross-relationship ratios of nucleotide sequences among red drum, oblong rock fish, grouper, flounder and striped jack NNV coat protein region

| | Red drum NNV Korea | ORF* NNV Korea | Grouper NNV Tiwan | Flounder NNV Japan | SJNNV Japan |
|--------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Red drum NNV | 100% | 98% | 97% | 86% | 74% |
| ORF NNV | | 100% | 96% | 85% | 72% |
| Grouper NNV | | | 100% | 86% | 51% |
| Flounder NNV | | | | 100% | 52% |
| SJNNV | | | | | 100% |

*ORF: Oblong rock fish

Grouper : agtgttcgactgagcgttccatctctttgagacacctgaagagaccaccgctcccatcatg
 SJNNV : c-cc--a-tg-cccgtcc-ttgagacacctgaggacaccaccg-tc-aat-a-t-c-ca-
 Red drum: -----
 Flounder: -----t-----g--t-----
 Oblong : -----
 rock fish

Grouper : acacaaggttccctgtacaacgattccctttccacaaatgacttcaaatccatcctccta
 SJNNV : g-g-c-ctcca-aacg-ttc-at-aa-aacggttac-c--ga--tcgt-----t--t-g
 Red drum: -----
 Flounder: -----cg-tg--gca-----g-----g
 Oblong : -----
 rock fish

Grouper : ggatccacaccactggacattgccctgatggagcagtcctccagctggaccgtccgctg
 SJNNV : --c-g-c-a--c--c-c--t---caaac--t----tgctact---aaa--t--
 Red drum: -----
 Flounder: --g-----agt-----t-c---g--a--t--at--t--a--at--
 Oblong : -----
 rock fish

Grouper : tccattgactacagccttggaaactggagatggtggaccgtgctgtttactggcacctcaa
 SJNNV : c-----t---at-----gtg--c--cg--c-----g--c--g-----gc-
 Red drum: -----g--t-----
 Flounder: -----a-----t-----c-----c-----
 Oblong : -----g--t-----
 rock fish

Grouper : gaagtttgctggaaatgctggcacacctgcaggctggtttcgctggggcatctgggacaa
 SJNNV : ---aaa-----ca--caggt-----t--g-ac--ga-----ac-g-----tg-
 Red drum: -----
 Flounder: -----cat--tc-----gc-t-----t-----
 Oblong : -----
 rock fish

Grouper : cttcaacaagacgttcacagatggcgttgccctactactctgatgagcagccccgtcaaat
 SJNNV : --t-----a--a--t--g-cgc-----c-cc---a--a--g-----
 Red drum: -----t-----
 Flounder: -----g--t-----c-c-----t-----
 Oblong : -----g-g-----t-----
 rock fish

Grouper : cctgctgcctgttggcactgtcctgctgcctgttggcactg
 SJNNV : -t-----g-c-----gc--t-cacc-----t-g-
 Red drum: -----t-caac-g---a-t-g-
 Flounder: t--c---c-----c---tgaccagg---a-t-g-
 Oblong : -----
 rock fish

Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of the coat protein gene in the NNV of grouper, striped jack, red drum, flounder and oblong rock fish.

- Fukuda, Y., H.D. Nguyen, M. Furuhashi and T. Nakai. 1996. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31, 165~170.
- Kim, J.D., S.R. Kim, S.J. Jung, Y.J. Kim, T.S. Jung, T.J. Choi, S.W. Park and M.J. Oh, 2001. Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *J. Fish Pathol.* 14, 91~95.
- Munday, B.L. and T. Nakai. 1997. Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 375~381.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18, 103~107.
- Nishizawa, T., M. Furuhashi, T. Nagai, T. Nakai and K. Muroga. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1633~1636.
- Pavoletti, E., M. Prearo, M. Ghittino and C. Ghittino. 1998. Cases of viral nervous necrosis (VNN) in shy drum, *Umbrina cirrosa* with description of clinical symptomatology and anatomo-histopathological features. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica.*, 10, 24~33.
- Sohn, S.G., M.A. Park, M.J. Oh and S.K. Chun. 1998. A fish nodavirus isolated from cultured sevenband grouper, *Eponephelus septemfasciatus*. *J. Fish Pathol.*, 11, 97~104.
- Tanaka, S., H. Aoki and T. Nakai. 1998. Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, 33, 31~36.
- Thiery, R., C. Arnauld and C. Delsert. 1999. Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, 22, 201~207.
- Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41, 219~223.
- Zafran, I. Koesharyani, F. Johnny, K. Yuasa, T. Harada and K. Hatai. 2000. Viral nervous necrosis in humpback grouper, *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathol.*, 35, 95~96.

2001년 11월 26일 접수
2002년 4월 23일 수리