

국내에서 분리된 사람 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열 분석 및 발현

정동혁¹, 송윤경, 김경미, 박효선, 백명순, 강신영*

¹(주)바이오인디스트, 충북대학교 수의과대학/동물의학연구소
(게재승인 : 2002년 3월 2일)

Nucleotide sequence analysis and expression of NSP4 gene of human rotaviruses isolated in Korea

Dong-hyuk Jung*, Yun-kyung Song, Kyung-mi Kim,

Hyo-sun Park, Myoung-soon Back, Shien-young Kang

¹Bioindist Co., Ltd, Whasung, Korea, Research Institute of Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju, Korea

(Accepted : March 2, 2002)

Abstract : The nonstructural glycoprotein NSP4, encoded by the 10th gene of rotavirus, has been known to play important roles in viral assembly and pathogenesis. The NSP4 genes of human rotavirus Korean isolates, designated as CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3, and CBNU/HR-4, were cloned, sequenced and characterized. Also, the NSP4 gene of the CBNU/HR-1 was expressed in a baculovirus-insect cell system. The sequence data indicated that the NSP4 genes of human rotavirus Korean isolates were 750 or 751 bases in length and encoded one open reading frame of 175 amino acids. Two glycosylation sites were recognized in the NSP4 gene of human rotavirus isolates tested. The NSP4 of CBNU/HR-1, CBNU/HR-3, and CBNU/HR-4 exhibited a high degree of amino acid sequence homology with that of NSP4 genotype B viruses, but a low degree of amino acid sequence homology with that of NSP4 genotype A viruses. However, the NSP4 of CBNU/HR-2 exhibited a high degree of amino acid sequence homology with that of NSP4 genotype A viruses, but a low degree of amino acid sequence homology with that of NSP4 genotype B viruses. The Sf9 cells infected with recombinant baculovirus, inserted with NSP4 gene of CBNU/HR-1, produced specific cytopathic effects and the expressed NSP4 was detected by immunofluorescence staining using NSP4-specific monoclonal antibody(MAb). The expressed NSP4 migrated at 16-26 kDa on SDS-PAGE and reacted with NSP4-specific MAb by Western blotting.

Key words : Human rotavirus, NSP4, nucleotide sequence, baculovirus, expression

서 론

Reoviridae과(Family)에 속하는 로타바이러스는 어린 아이는 물론 여러 종류의 동물에서 급성장염을 일으키는 원인체로 알려져 있다.^{1,3} 로타바이러스의 유전자는 11개의 분절로 되어 있는 dsRNA로 각각의 유전자는 6

개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 5개의 비구조단백질(NSP1~5) 중 하나를 encoding하며 triple layered protein capsid, 즉 outer capsid, inner capsid, 그리고 core protein으로 싸여 있다^{4,8}.

Inner capsid 단백질인 VP6는 subgroup 특이성을 가지고 있으며 outer capsid 단백질인 VP4와 VP7은 각각 P

* Corresponding author : 82-43-261-2598(phone), sykang@cbucc.chungbuk.ac.kr(e-mail)
이 논문은 1998년 충북대학교 발전기금재단 연구비에 의하여 연구되었음

type(Protease sensitive protein type) 혈청형과 G type (Glycoprotein type) 혈청형을 결정하며 이들은 독립적으로 중화항체형성에 관여하여 바이러스 감염시 방어에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{9,10}.

로타바이러스의 10번째 유전자에 의하여 encoding 되는 비구조단백질 중의 하나인 NSP4는 당단백으로서 로타바이러스의 morphogenesis에 관여하며 calcium 의존 신호전달경로에 의한 chloride 분비를 야기시키는 enterotoxin으로 작용하여 로타바이러스의 병원성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹⁸. 특히 Zang *et al*¹⁹은 돼지 로타바이러스의 NSP4에서 병원성과 관련된 부위를 확인하기 위해 병원성이 강한 돼지 로타바이러스와 이를 약독화시킨 바이러스의 NSP4 유전자 염기서열을 비교 분석하여 염기서열 432-461(아미노산서열 131-140) 부위가 병원성과 관련이 있는 것을 확인하고 mouse를 이용한 생체 내 실험과 장 상피세포를 이용한 *in vitro* 실험을 통하여 증명하였다. 최근에 Ciarlet *et al*²⁰은 사람을 포함한 여러 동물 유래의 로타바이러스를 이용하여 NSP4 유전자의 종특이성 및 종간의 관련성을 조사한 결과 4개의 서로 다른 NSP4 allele가 존재함을 보고하였다. 국내에서는 Back *et al*²¹이 국내에서 분리된 소 로타바이러스의 NSP4 유전자의 염기서열을 확인하여 보고하였다.

본 연구에서는 국내에서 어린 아이의 설사분변으로부터 분리한 혈청형이 서로 다른 4개의 사람 로타바이러스 NSP4 유전자를 크로닝하고 염기서열을 확인하여 이미 보고된 로타바이러스의 NSP4 유전자와 비교하였으며 NSP4의 분자생물학적인 특성을 규명하기 위해 baculovirus expression system을 이용하여 NSP4 유전자를 발현시켰다.

재 료 및 방 법

바이러스와 세포

국내에서 어린 아이의 설사분변으로부터 분리하여 조직배양에 순화된 사람 로타바이러스 CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3, 그리고 CBNU/HR-4를 사용하였다. 이들 바이러스는 각각의 혈청형에 특이적으로 반응하는 단크론항체를 이용한 효소면역법과 VP7의 염기서열분석으로 각각 G1, G2, G3 그리고 G4로 확인되었다(자료미제시). 이들 바이러스는 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포에서 Saif *et al*²²의 방법으로 배양하였다.

바이러스 RNA 추출과 정제

로타바이러스 RNA는 Rosen *et al*²³의 방법을 이용하여

추출하고 RNaid[®]KIT with SPIN[™](BIO 101, Inc., USA)을 사용하여 제조사의 술식에 의하여 정제하였다. 정제된 RNA는 DEPC(Diethylpyrocarbonate)로 처리된 증류수에 용해하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

RT-PCR(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

NSP4 유전자는 NSP4 특이 primer를 사용하여 Gouvea *et al*²⁴의 방법에 따라 RT-PCR을 수행하였으며 NSP4 특이 primer는 GenBank의 data를 기초로 하여 NSP4 유전자 전체(750-751bp)를 증폭할 수 있도록 제작하였다. 순수 분리한 RNA 10 μ l에 2 μ l의 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 첨가하고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000 rpm에서 5초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 μ l, 5 \times first strand buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 5 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(200 U/ μ l) 1 μ l을 순서대로 넣어 반응용량 50 μ l를 37°C에서 60분간 반응시켜 cDNA 합성을 하였다. 합성된 cDNA template 10 μ l에 DEPC 처리된 증류수 63 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 12 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, forward primer(5'-GGCTTTT AAAAGTCTGTTC-3') 1 μ l, reverse prime(5'-GGTCAC ACTAAGACCATTCC-3') 1 μ l, Taq DNA polymerase(5 U/ μ l) 1 μ l를 넣어 전체반응용량 100 μ l를 pre-PCR(95°C, 5 min), PCR (denaturation 94°C/45 sec, annealing 50°C/45 sec, extension 72°C/1 min, 25 cycles) 그리고 post-PCR(72°C, 7 min)을 핵산증폭기(GeneAmp PCR system 2400, Perkin- Elmer, USA)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 100 volt로 30분 간 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 NSP4 유전자 크기는 1 kb DNA ladder (GibcoBRL, USA)를 같이 전기영동함으로써 확인하였다.

Cloning 및 염기서열 분석

NSP4 PCR 반응산물은 pGEM[®] T easy vector system II (Promega, USA)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 크로닝하였다. Recombinant plasmid로 competent cell을 형질 전환시킨 후 ampicillin(50 mg/ml, Amresco, USA), IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside, 20 mg/ml, Amresco), 그리고 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -D-galactoside, 20 mg/ml in Dimethylformamide)이 첨가된 LB agar에서 무색투명한 집락을 골라내어 ampicillin이 첨가된 LB broth에 배양한 다음 one step plasmid mini- preparation법²⁵으로 plasmid DNA를 분리하여 cDNA의 삽입여부를 확인하였다. cDNA 삽입여부는 추출된 plasmid를 EcoRI (10

U/ μ l, GibcoBRL)으로 37°C에서 1시간 반응하여 벡터와 insert를 소화시킨 후 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 insert의 삽입유무와 크기를 확인하였다.

DNA 염기서열은 automatic DNA sequencer 310(Perkin-Elmer)으로 확인하고 Clustal W와 DNASIS 프로그램을 이용하여 비교 분석하였다.

Baculovirus expression system을 이용한 NSP4 유전자 발현

(1) 세포

Spodoptera frugiperda 9(Sf9) 세포는 yeastolate, lactalbumin hydrolysate, fetal calf serum(FCS)이 첨가된 Grace's insect media를 사용하여 배양하였다.

(2) 재조합 바이러스 생산

Polyhedrin promoter를 포함하고 있는 baculovirus expression vector인 pCR[®]Bac(Invitrogen, USA)에 NSP4 유전자를 삽입하여 만든 발현 vector pCR BacNSP4는 Bac-N-blue[™] transfection kit(Invitrogen)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 작성하였다. 즉 Bac-N-blue wild type DNA 10 μ l(1 μ g)에 recombinant transfer plasmid DNA(1 μ g/ μ l) 4 μ l, FCS가 함유되어 있지 않은 Grace's insect media 1 ml, 그리고 InsectinPlus liposomes 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응하였다. FCS가 함유되어 있지 않은 Grace's insect media로 3회 세척한 Sf9 단층세포에 transfection 혼합액을 한방울 씩 떨어뜨린 후 실온에서 4시간 동안 천천히 흔들며 배양한 다음 10% FCS가 첨가되어 있는 complete Grace's insect media 1 ml를 넣어 plate를 밀봉한 후 27°C에서 72시간 동안 배양하였다. 재조합 바이러스는 transfection 용액을 complete Grace's insect media로 10-fold dilution법으로 희석하여 X-gal을 이용한 plaque assay를 이용하여 순수 분리하였다. 즉, Sf9 세포를 2×10^6 이 되도록 60 mm plate에 부착시킨 후 여기에 희석한 transfection virus 1 ml 씩 plate 전체에 방울방울 떨어뜨린 후 1시간동안 실온에서 천천히 흔들며 배양하여 바이러스를 세포에 흡착시켰다. 1시간 배양 후 접종액을 제거하고 2% agarose와 X-gal이 함유되어 있는 complete Grace's insect media 5ml씩 분주하였다. Plate의 agarose가 완전히 굳은 후 습기가 있는 용기에 plate를 넣어 27°C에서 5일간 배양한 뒤 푸른색의 plaque를 선별하였다. 선별한 plaque는 Sf9 세포에 moi 1.0으로 감염시킨 후 27°C에서 7-8일간 배양하고 세포 및 배양액을 회수하여 1,500 rpm에서 10분간 원심하여 상층액을 recombinant virus로 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

(3) 단크론항체 생산

MA104 세포를 75 cm² flask에 배양한 후 G1 혈청형인 사람 로타바이러스 Wa를 접종하고 CPE가 일어나기 전인 감염 24시간 후에 감염된 세포를 rubber policeman을 이용하여 수확하였다. 이를 3,000 rpm에서 30분간 원심하여 상층액 제거 후 pellet을 멸균된 lysis buffer(0.01 M Tris pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 0.1% NaN₃)로 재부유시켜 다시 원심하여 상층액을 단크론항체 생산용 항원으로 사용하였다. 사람 로타바이러스 Wa의 비구조단백질에 특이적으로 반응하는 단크론항체는 Wa 항원을 접종한 BALB/c mouse의 비장세포와 SP2/O myeloma 세포를 Kohler와 Milstein²⁶의 방법과 Kang *et al*²⁷의 방법을 응용하여 세포융합을 실시함으로써 생산하였다. 비구조단백질에 특이적인 항체를 생산하는 양성 hybridoma 세포는 간접형광항체법(Indirect fluorescent antibody)으로 선별한 후 3회 이상 limiting dilution법으로 크로닝하였으며 최종적으로 크로닝된 hybridoma는 pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane)으로 미리 감작시킨 BALB/c 마우스에 접종하여 복수를 생산하였다.

(4) Recombinant virus 확인을 위한 간접형광항체법

Plaque법으로 순수분리한 recombinant virus가 NSP4를 발현하는가를 확인하기 위하여 간접형광항체법을 사용하였다. 즉 Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 recombinant baculovirus를 접종하여 48시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하였다. 사람 로타바이러스 Wa NSP4에 특이적으로 반응하는 단크론항체를 1차 항체로 100 μ l씩 넣어 37°C에서 1시간 반응 후 PBS(Phosphate buffer saline)로 5회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Lab., USA)를 1:100으로 희석하여 50 μ l씩 넣어 1시간 배양 후 PBS로 5회 세척한 뒤 mounting buffer를 넣어 형광현미경으로 관찰하였다.

(5) Western blotting

Recombinant virus와 wild type baculovirus를 각각 접종하여 27°C에서 48시간동안 배양하여 수확한 Sf9 세포와 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포, 그리고 MA104 세포에 사람 로타바이러스 Wa를 접종한 후 CPE가 생기기 전에 수확한 세포와 바이러스를 접종하지 않은 MA104 세포 모두를 flask로부터 떨어뜨려 원심분리한 뒤 얻은 pellet을 SDS-PAGE 및 Western blot 재료로 사용하였으며 Towbin *et al*²⁸의 방법에 따라 Western blot을 실시하였다. 각각의 pellet 상층액을 sample buffer(60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 1.44 mM 2-

mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 1:5의 비율로 섞어 100°C에서 5분간 가열하여 denaturation 시켰다. 이를 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 2시간동안 80 volt로 전기영동을 한 다음 gel을 꺼내어 transfer buffer (15.6 mM Tris base, 120 mM glycine, pH 8.1-8.4)에 30분간 방치하였다. 미리 transfer buffer에 담궈 놓은 filter paper와 nitrocellulose paper(NEN™ Life Science Products, USA)사이에 gel을 넣어 semi trans-blot(Bio-rad, USA)를 이용하여 13 volt로 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 : TBS)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 NSP4 특이 단클론항체를 사용하여 1시간동안 실온에서 흔들며 반응시켰으며 TBS로 3회 세척하였다. 그리고 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Lab.)을 1:2,000 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 이를 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution(Boehringer mannheim, USA) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) 10 ml에 섞어 사용하였다.

결 과

RT-PCR

사람 로타바이러스 CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4로부터 추출한 RNA와 NSP4에 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 750bp 크기의 NSP4 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(Fig 1).

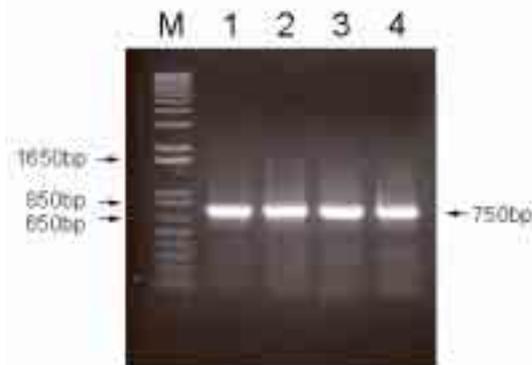


Fig 1. Amplification of NSP4 gene of human rotaviruses, CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3, and CBNU/HR-4 by RT-PCR.

Lane M: 1kb DNA ladder, lane 1; CBNU/HR-1, lane 2; CBNU/HR-2, lane 3; CBNU/HR-3, lane 4; CBNU/HR-4.

NSP4 유전자 염기서열 분석

CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자 염기서열을 분석한 결과 CBNU/HR-1, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자는 750개의 염기로 구성되어 있으나 CBNU/HR-2의 NSP4 유전자는 751개의 염기로 구성되어 있었다. 하지만 이들 모두 175개의 아미노산을 encoding하는 1개의 open reading frame을 가지며 있었으며 2부위(염기서열 63-71, 93-101)에 glycosylation site가 존재하는 것을 확인하였다.

NSP4 유전자 아미노산서열 분석

CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자와 GenBank에 보고된 동물 및 사람 로타바이러스 NSP4 유전자의 추정 아미노산서열을 다중 정렬하여 서로 간의 아미노산서열을 비교한 결과는 Table 1과 Fig 2에 나타나 있다. 동물 및 사람 로타바이러스 NSP4 유전자의 아미노산서열 상동성을 비교한 결과, CBNU/HR-1, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자는 서로 간에는 92.0-92.5%의 아미노산서열 상동성을 보였으며 사람 로타바이러스 Wa(G1), YO(G3), ST3(G4), OSU(G5), AU32(G9), YM (G11) 등과는 91.4-97.1%의 아미노산서열 상동성을 보인 반면 CBNU/HR-2와는 83.4-85.1%의 아미노산서열 상동성을 보였다. 반면 CBNU/HR-2는 같은 혈청형의 KUN(G2), RV5(G2), DS-1(G2)과는 94.2-98.8%의 아미노산서열 상동성을 보였으며 다른 혈청형의 동물 로타바이러스인 SA11(G3), UK(G6) 그리고 B223(G10)와는 94.2%, 93.7%, 그리고 92.0%의 아미노산서열 상동성을 보였다. 하지만 CBNU/HR-1, CBNU/HR-3, CBNU/HR-4를 포함한 Wa, YO, ST3, OSU, AU32, YM 등과의 아미노산서열 상동성은 82.8- 86.2%이었다. 로타바이러스 간의 아미노산서열을 비교한 결과, 아미노산서열의 차이는 NSP4 단백질의 N 말단부위, VP4 결합부위(VP4-binding region: 아미노산서열112-148) 그리고 DLP 결합부위(DLP-binding region: 아미노산서열 161-175)에 집중되어 있었다. Hydrophobic domain H2와 H3 부위에서는 사람 로타바이러스 간에 비교적 아미노산서열이 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다.

60

	<u>H1</u>	<u>H2</u>
CBNU/HR-1	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
CBNU/HR-2	MEKFTDLNYTLSV TLMNSTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
CBNU/HR-3	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
CBNU/HR-4	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
Wa	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
DS-1	MEKLTDLNYTLSV TLMNNTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
RV5	MEKLTDLNYTLSV TLMNNTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
KUN	MEKFTDLNYTLSV TLMNSTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
Y0	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
ST3	MDKLADLNYTLSV TSMNDTLHS	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKA
PA151	MEKLTDLNYTLSV TLMNSTLHT	I MEDPGMAYFPY AFVLTVLFTLHKAS PTMK ALRT
AU32	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
L26	MEKLTDLNYTLSV TLMNNTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
SA11	MEKLTDLNYTLSV TLMNNTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
UK	MEKLTDLNYTLSV TLMNSTLHT	ILEDPGMAYFPY VSVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
B223	MEKLTDLNYTLSV TLMNSTLHT	ILEDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
OSU	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT
YM	MDKLADLNYTLSV TLMNDTLHS	IQDPGMAYFPY ASVLTVLFTLHKAS PTMK ALKT

* * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** *****

120

	<u>H3</u>
CBNU/HR-1	SKCSYKVIKYC VT INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQLEM DKLTTRE
CBNU/HR-2	SKCSYKVVKYC VT INTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
CBNU/HR-3	SKCSYKVIKCC VT I STLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR I KEMRRQLEM DKLTTRE
CBNU/HR-4	SKCSYKVIKYC VT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMAR VKEMRRHLEM DKLTTRE
Wa	SKCSYKVIKYC VT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQLEM DKLTTRE
DS-1	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
RV5	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
KUN	SKCSYKVVKYC VT INTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
Y0	SKCSYKVIKHC VT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQLEM DKLTTRE
ST3	SKCSYKVIKYCVVT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQLEM DKLTTRE
PA151	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKE RRQLEM DRLTTRE
AU32	SKCSYKVIKCC VT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQLEM DKLTTRE
L26	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLK AGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
SA11	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
UK	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMDRVVKEMRRQLEM DKLTTRE
B223	SKCSYKVVKYC VT IFNTLLKLAGYKEQ TTKDE EKQMERVVKEMRRHFKM DKLTTRE
OSU	SKCSYKVIKYCMVT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR I KEMRRQLEM DKLTTRE
YM	SKCSYKVIKYCMVT I INTLLKLAGYKEQVTTKDE EQQMDR VKEMRRQPRM DKLTTRE

***** * * * * * ***** * ***** * * * * * ***** *****

to be continued

	<u>VP4-Binding Region</u>	<u>DLP-Bindgin Region</u>
CBNU/HR-1	<u>IEQGELLKRIHDNLITRPVDITDMTKEFNQKNIKTLDEWENGKNPYEPTASMI</u>	
CBNU/HR-2	IEQVELLKRIDYDKLIVRSTDEIDMTKEINQKNIRTLLEEWESGKNPYEPKEVTAAMI	
CBNU/HR-3	IEQVELLKRIDHDNLIKIPVDVIDMSKEFNQKNIKTLDEWESGKNPYEPLVETASMI	
CBNU/HR-4	IEQVEWLKRIDHDNLITRSVNVIDISKQFNQKNIKTLDEWESGKNPYEPSEVTASMI	
Wa	IEQVELLKRIDHDNLITRPVDVIDMSKEFNQKNIKTLDEWESGKNPYEPSEVTASMI	
DS-1	IEQVELLKRIDYDKLMVRSTDEIDMTKEINQKNVRTLEEWENGKNPYEPKEVTAAMI	
RV5	IEQVELLKRIDYDKLMVRSTGEIDMRKEINQKNVRTLEEWENGKNPYEPKEVTAAMI	
KUN	IEQVELLKRIDYDKLIVRSTGEIDMTKEINQKNVRTLEEWESGKNPYEPKEVTAAMI	
YO	IEQVELLKSIDHDNLITTKPVDVIDMSKEFNQKNIKTLDEWVSGKNPYEPSEVTASMI	
ST3	IEQIELLKRIDHDNLITRPVNVIDMSMEFNQKNIKTLDEWESRKNPYEPSEVTASMI	
PA151	IEQVELLKRIDHDKLMARSTDGIDMTKEINQKNVKTIEEWENGRNPYEPKEVTAAMI	
AU32	IEQVELLKRIDHNNLIIKIPVDVIDMSKEFNQKNIKTLDEWEGGKNPYEPLVETASMI	
L26	IEQVELLKRIDHDKLMVQSTGEIDMTKEINQKNVKTLEEWESGRNPYEPKEVTAAMI	
SA11	IEQVELLKRIDYDKLTVQTTGEIDMTKEINQKNVRTLEEWESGKNPYEPREVTASMI	
UK	IEQVELLKRIDHDKLMIRTVDEIDMTKEINQKNVRTLEEWENGRNPYEPKEVTAAMI	
B223	IEQVGLLKRIDHDKLDIRAVDEIDMTKEINQKNVRTLEEWEGKNPYEPKEVTAAMI	
OSU	IEQVELLKRIDHDKLAARSVDAIDMSKEFNQKNIRTLDEWESGKNPYEPSEVTASMI	
YM	IEQVELLKRIDHDKLVTRPVDVIDMSKEFNQKNIKTLDEWESGKNPYEPSEVTASMI	
	*** ** * * ** ***** * ** **** * ***** *	

Fig 2. Comparison of the deduced amino acid sequences of the NSP4 gene of CBNU/HR-1, 2, 3, 4 and other human and animal rotavirus strains. The hydrophobic domains are indicated as H1, H2, and H3. The VP4- and DLP-binding regions are indicated. The NSP4 sequences of CBNU/HR-1, 2, 3, and 4 were determined in this study. Asterisks indicate the identical amino acid sequences among rotavirus strains compared. Other NSP4 amino acid sequences of human and animal rotaviruses were obtained from GenBank database: Wa (GenBank accession No. AF093199), DS-1(AF174305), YO (AB008236), ST3(U59110), OSU(D88831), PA151(AJ311733), UK(M21885), AU32(D88830), B223(AF144805), L26 (AJ311732), SA11(AF087678), RV5(U59103), KUN(D88829), YM(X69485)

Phylogenetic analysis

CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자에 대해 상관성을 조사하기 위해서 Table 1의 결과를 phylogenetic tree로 작성하여 비교한 것은 Fig 3과 같다. Phylogenetic tree는 전체적으로 두 갈래로 분류가 되었으며 CBNU/HR-2는 KUN, CBNU/HR-3는 AU32 그리고 CBNU /HR-4는 ST3와 유전적으로 가장 밀접하게 관련되어 있는 것으로 나타났다. 하지만 CBNU/HR-1은 CBNU/HR-3, CBNU/HR-4, AU32, YO, Wa, ST3, YM 그리고 OSU 등과 전체적으로 유전적 연관성이 있음을 보였다.

NSP4 유전자 발현

- (1) 단크론항체생산
사람 로타바이러스 Wa strain의 비구조단백질에 특이

적으로 반응하는 단크론항체를 생산하기 위하여 세포융합을 실시한 결과 4개의 Wa 로타바이러스 특이 단크론항체를 생산하였는데 2개의 단크론항체는 구조단백질인 VP6에 특이적인 것으로 확인되었으며 한 개의 단크론항체는 비구조단백질인 NSP4에 특이적인 것으로 확인되었다. 다른 한 개의 단크론항체는 Western blotting 상에서 여러 개의 band가 형성되어 단백질성을 확인할 수 없었다(자료미제시).

- (2) Recombinant virus에 의한 세포변성효과

Recombinant baculovirus와 wild type baculovirus를 Sf9 세포에 감염시킨 결과 Fig 4와 같은 세포변성효과(Cytopathic effects:CPE)를 관찰할 수 있었다. 즉, 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포(A)에서는 어떠한 세포 변성효과를 관찰할 수 없었으나 polyhedrin 유전자를 결

Table 1. NSP4 amino acid sequence identities(%) of CBNU/HR-1, 2, 3, 4, and other human and animal rotavirus strains

Strain	Percentage homology to																	
	HR-1 ^a	HR-3 ^b	HR-4 ^c	Wa	YO	ST3	OSU	AU32	YM	HR-2 ^d	KUN	RV5	DS-1	SA11	PA151	UK	B223	
HR-1 ^a (G1)																		
HR-3 ^b (G2)	92.5																	
HR-4 ^c (G4)	92.0	92.0																
Wa(G1)	96.0	96.0	96.0															
YO(G3)	92.5	94.2	92.5	96.5														
ST3(G4)	92.0	91.4	92.5	95.4	92.0													
OSU(G5)	92.0	93.1	92.5	95.4	92.5	91.4												
AU32(G9)	93.7	97.1	92.5	96.5	94.8	92.0	92.5											
YM(G11)	92.5	92.5	92.5	96.5	93.7	92.5	94.8	93.1										
HR-2 ^d (G2)	85.1	83.4	83.4	86.2	82.8	82.8	86.2	84.0	84.0									
KUN(G2)	84.0	82.2	82.8	85.1	81.7	82.2	85.1	82.8	82.8	98.8								
RV5(G2)	82.8	80.5	81.1	83.4	80.5	80.5	84.0	81.7	81.7	94.2	95.4							
DS-1(G2)	84.5	81.7	81.7	84.5	81.7	81.1	85.1	82.8	84.0	96.0	96.0	97.1						
SA11(G3)	82.8	81.7	81.1	84.0	82.2	81.1	84.0	82.2	83.4	94.2	95.4	94.8	96.5					
PA151(G6)	82.8	80.0	80.0	82.8	80.0	79.4	82.8	81.1	81.1	91.0	90.8	90.8	92.5	89.1				
UK(G6)	85.1	82.8	81.7	85.1	82.2	81.7	85.1	84.0	83.4	93.7	93.7	93.7	95.4	93.1	93.1			
B223(G10)	82.8	81.1	81.7	83.4	80.5	80.0	83.4	82.2	82.8	92.0	92.0	90.8	92.5	90.8	89.1	94.2		
L26(G12)	83.4	82.2	82.2	84.5	82.2	81.7	84.0	82.8	82.8	93.1	94.2	94.2	94.8	94.8	92.0	93.7	90.2	

^{a, b, c, d} CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3, and CBNU/HR-4 are indicated as HR-1, HR-2, HR-3, and HR-4 respectively. NSP4 sequences of CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3, and CBNU/HR-4 were determined in this study. Other human and animal rotavirus sequences were obtained from GenBank database : Wa (GenBank accession No. AF093199), DS-1 (AF174305), YO (AB008236), ST3 (U59110), OSU (D88831), PA151 (AJ311733), UK (M21885), AU32 (D88830), B223 (AF144805), L26 (AJ311732), SA11 (AF087678), RV5 (U59103), KUN (D88829), YM (X69485).

손시키고 그 자리에 NSP4 유전자를 삽입시킨 recombinant virus가 감염된 Sf9 세포(B)에서는 감염 후 polyhedrin은 형성되지 않고 세포가 커지는 recombinant virus 특유의 CPE를 관찰할 수 있었다.

(3) 간접 형광항체법에 의한 recombinant virus 확인
 사람 로타바이러스 Wa의 NSP4에 특이적인 단클론항체를 사용하여 간접형광항체법으로 recombinant virus의 발현을 확인한 결과 Fig 4와 같이 recombinant virus가 감염된 Sf9 세포(D)에서만 강한 형광이 관찰되었다. 그러나 바이러스를 접종하지 않은 대조군(C)에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

(4) SDS-PAGE와 Western blot에 의한 NSP4 확인
 발현된 NSP4의 성상을 SDS-PAGE와 Western blot법으로 확인한 결과는 Fig 5와 같다. SDS-PAGE를 실시한 후 Coomassie blue로 염색하여 본 결과 뚜렷한 NSP4 band

를 확인할 수 없었다. 그러나 사람 로타바이러스 NSP4에 특이적으로 반응하는 단클론항체와 사람 로타바이러스 Wa strain에 특이적인 guinea pig 항혈청을 사용하여 Western blot을 한 결과 뚜렷한 NSP4를 확인할 수 있었으며 NSP4가 glycosylation된 정도에 따라 크기를 달리하는 것을 관찰하였다. 사람 로타바이러스 Wa strain에 특이적인 guinea pig 항혈청을 사용하여 Western blot을 수행한 결과 CBNU/HR-1 바이러스가 감염된 MA104 세포 lysate에서 발현된 NSP4는 관찰할 수 없었으나 recombinant virus가 감염된 Sf9 세포 lysate에서는 발현된 NSP4가 16-26 kDa의 위치에서 모두 뚜렷하게 관찰되었다.

고 찰

최근 사람 및 동물 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열 분석결과, 로타바이러스 사이에는 NSP4 유전자의 염기서열 상동성에 따라 서로 다른 NSP4 유전자형이

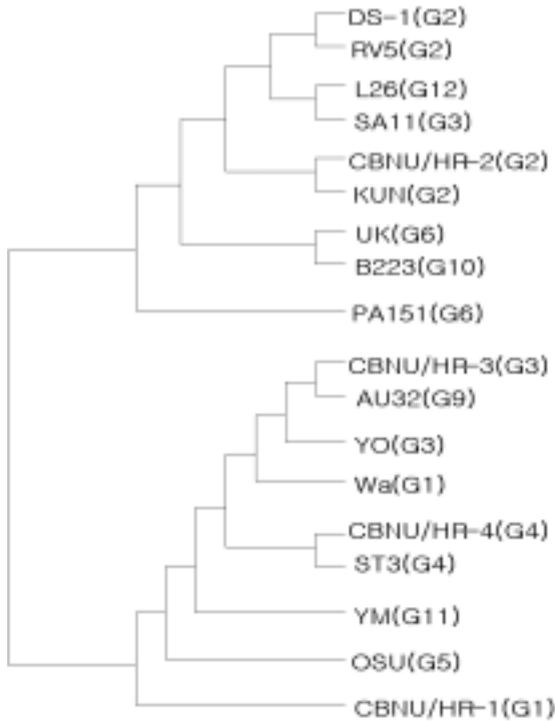


Fig 3. Phylogenetic tree for the NSP4 amino acid sequences of CBNU/HR-1, 2, 3, 4, and other human and animal rotavirus strains. The phylogenetic tree was constructed with the N-J plot program in the CLUSTAL W package.

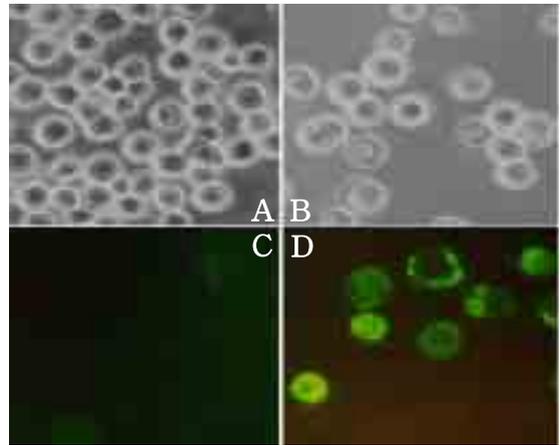


Fig 4. Cytopathic effects and immunofluorescence produced by recombinant virus in Sf9 cell ($\times 200$).

Sf9 cells were infected with mock(A) and recombinant virus(B) for 48 hr at 27°C. Mock(C) and recombinant virus(D) infected Sf9 cells were reacted with NSP4-specific monoclonal antibody.

존재한다고 보고되었다^{8,20,29,30}. Kirkwood *et al*⁸은 사람 및 동물 로타바이러스의 NSP4 유전자를 분석한 결과, 사람 및 동물의 로타바이러스는 NSP4 유전자의 염기서열에 따라 NSP4 genotype A, B 그리고 C로 분류할 수 있다고 보고하였다. 이들의 연구결과에 따르면, NSP4 genotype A에 속하는 로타바이러스의 NSP4 유전자는 751개의 염기로 되어있고, 이들끼리의 염기서열 상동성이 91% 이상이며, G2 혈청형의 사람 로타바이러스인

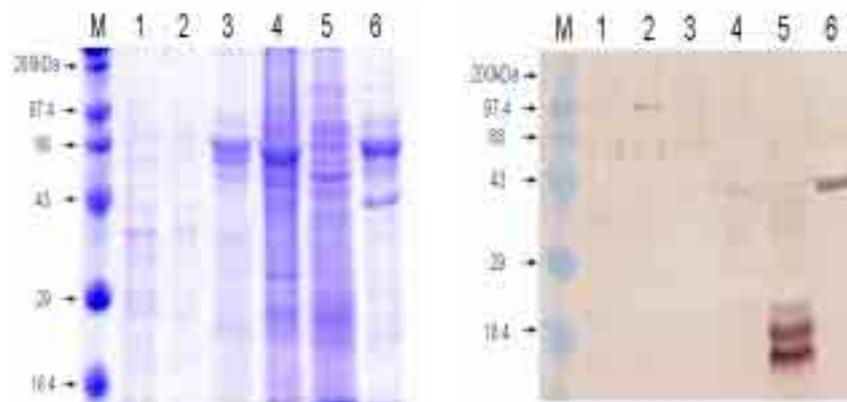


Fig 5. Analysis of expressed NSP4 by SDS-PAGE(A) and Western blotting(B).

Lane M; molecular weight marker, lane 1; mock-infected MA104 cell lysate, lane 2; human rotavirus-infected MA104 cell lysate, lane 3; wild type virus-infected Sf9 cell lysate, lane 4; mock-infected Sf9 cell lysate, lane 5; NSP4 recombinant virus-infected Sf9 cell lysate, lane 6; NSP4 recombinant virus-infected Sf9 cell supernatant.

RV5, S2, 1076, E201 그리고 E210과 원숭이 로타바이러스인 SA11 그리고 소 로타바이러스인 UK 등이 이에 속한다고 보고하였다. 반면에 NSP4 genotype B에 속하는 로타바이러스의 NSP4 유전자는 750개의 염기로 되어있으며 이들끼리의 염기서열 상동성이 93% 이상이며, 사람 로타바이러스인 Wa, RV4, VA70, M37, RV3 그리고 ST3와 돼지 로타바이러스 YM이 이에 속하는 것으로 보고하였다. 또한 원숭이 로타바이러스인 RRV는 NSP4 genotype A에 속하는 로타바이러스와 같이 751개의 염기로 구성되어 있지만 염기서열을 비교한 결과, 이들과의 염기서열 상동성이 81-85%밖에 되지 않아 NSP4 genotype A와는 구별되는 NSP4 genotype C로 구별하였다. 또한 Ciarlet *et al*²⁰은 쥐 로타바이러스의 NSP4 유전자를 사람 및 동물 로타바이러스의 NSP4 유전자와 비교한 결과 60-65%의 낮은 아미노산 상동성을 보여 새로운 유전자형인 NSP4 genotype D로 분류 보고하였다.

본 연구에서 국내에서 분리된 혈청형이 서로 다른 사람 로타바이러스 CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4 NSP4 유전자의 염기서열분석 결과, 국내에서 분리된 사람 로타바이러스의 NSP4 유전자는 750개의 염기(CBNU/HR-1, CBNU/HR-3, CBNU/HR-4) 또는 751개의 염기(CBNU/HR-2)로 구성되어 있으며 175개의 아미노산을 encoding 하는 1개의 open reading frame과 2개의 glycosylation 부위가 존재하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 현재까지 보고된 G1, G3, G4 혈청형에 속하는 모든 로타바이러스의 NSP4 유전자의 염기가 751개로 구성되어 있으며 G2에 속하는 로타바이러스의 NSP4 유전자의 염기가 750개로 구성되어있다는 보고와 일치하였다^{8,11,13}. 또한 포유동물에서 분리된 로타바이러스의 NSP4 유전자는 175개의 아미노산을 encoding하는 하나의 open reading frame과 2개의 glycosylation 부위를 가지고 있다는 보고와도 일치하였다^{14,20}. CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자를 크로닝하고 염기서열을 분석하여 추정 아미노산을 혈청형 G1, G2, G3 그리고 G4의 사람 로타바이러스와 상동성 및 보존되는 부위 그리고 차이를 보이는 부위를 조사한 결과, CBNU/HR-1의 NSP4 유전자와 같은 혈청형인 사람 로타바이러스 Wa (G1)와 추정 아미노산서열을 비교해 본 결과, 두 바이러스간의 아미노산 상동성은 96.0%를 보였다. 두 로타바이러스의 아미노산서열 차이는 VP4-binding region (aa112-148)과 double-layered particle(DLP)-binding region(aa161-175)에 집중되어 있었으며, hydrophobic domain인 H1(aa7-21), H2(aa28-47), 그리고 H3(aa67-85)에서는 H3 부위의 아미노산 한 개를 제외하고는 차이를 보이지 않았다. CBNU/HR-2의 NSP4

유전자와 같은 혈청형인 사람 로타바이러스 KUN(G2)의 추정 아미노산서열을 비교해 본 결과, 두 바이러스간의 아미노산 상동성은 98.8%를 보여 이 두 로타바이러스는 매우 유사하다는 것을 알 수 있었다. CBNU/HR-3의 NSP4 유전자의 아미노산 서열 상동성을 확인한 결과, 같은 혈청형인 YO(G3)와는 94.2%를 보였으며 AU32(G9)와는 97.1%를 보였다. 이로부터 NSP4 유전자의 유전적인 면에서 CBNU/HR-3은 AU32와 밀접히 관계가 있음을 보였다. CBNU/HR-4의 NSP4 유전자와 같은 혈청형인 사람 로타바이러스 ST3(G4)의 추정 아미노산서열을 비교해 본 결과, 두 바이러스간의 아미노산 상동성은 92.5%를 보였으며 두 로타바이러스의 아미노산서열 차이는 aa112-148의 VP4-binding region에 집중되어 있었으며, DLP-binding region과 hydrophobic domain인 H1, H2, 그리고 H3에서는 아미노산서열이 비교적 잘 보존되어 있었다. 본 연구에서 염기서열을 분석한 CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 아미노산서열과 GenBank에 보고된 동물 및 사람 로타바이러스 NSP4 유전자의 추정 아미노산서열을 다중 정렬하여 서로간의 아미노산서열을 비교한 결과 로타바이러스 간의 아미노산서열의 차이는 단백질의 N 말단부위, aa112-148의 VP4-binding region 그리고 aa161-175의 DLP-binding region에 집중되어 있었다. VP4-binding region에서의 아미노산서열의 차이는 이 부위에서 일어나는 VP4와 NSP4 간의 상호작용에 기인하는 것으로 보고되어있다³¹. 또한 이 부위는 로타바이러스의 병원성에 관련되어 있는 부분인 aa114-135부위를 포함하고 있기 때문에 아미노산의 서열에 변이가 존재하는 것으로 생각된다¹⁹. 아미노산서열의 차이가 집중된 N 말단부위는 NSP4 단백질이 endoplasmic reticulum(ER)에 부착하는 과정에 작용하는 hydrophobic domain H1을 포함하는 것으로 보고되었으며 transmembrane domain과 cytoplasm-binding domain으로 각각 작용하는 hydrophobic domain H2와 H3는 기능적으로 중요하다고 알려져 있는 부위³²로 이 부위에서는 사람 로타바이러스 간에 비교적 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다.

CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자와 GenBank에 보고된 동물 및 사람 로타바이러스 NSP4 유전자의 추정 아미노산서열의 상동성을 비교한 결과 두 개의 group으로 분류할 수 있었다. 본 연구에서 확인된 사람 로타바이러스를 4종 제외한 이외의 사람 및 동물 로타바이러스에 대해서 이미 Kirkwood *et al*⁸과 Ciarlet *et al*²⁰에 의해 분류되어진 결과와 비교했을 때, 대부분 일치하는 것을 볼 때, 이

두 group은 이미 분류된 NSP4 genotype A와 B로 생각할 수 있을 것이다. 본 연구에서 확인된 CBNU/HR-1, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자는 서로 간에 92.0-96.0%의 아미노산 상동성을 보였으며, 이미 NSP4 genotype B로 분류된 로타바이러스 Wa, ST3, YM, AU32 등과는 91.4-97.1%의 아미노산 상동성을 보였다. CBNU/HR-2는 같은 혈청형(G2)의 KUN와는 98.8%의 상동성을 보였으며, 이미 NSP4 genotype A로 분류된 로타바이러스 RV5, SA11, UK와는 92.0-94.2%의 아미노산 상동성을 보였다. 이것으로서 CBNU/HR-1, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4는 NSP4 genotype B로, CBNU/HR-2는 NSP4 genotype A로 분류할 수 있을 것이다. CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4의 NSP4 유전자에 대해 상관성을 조사하기 위해서 앞서 아미노산 상동성을 비교한 사람 및 동물 로타바이러스의 NSP4 유전자의 추정 아미노산을 이용하여 수상도를 작성한 결과도 두 개의 가지로 분류되어 NSP4 genotype A와 B로 나타내었다.

본 연구에서는 NSP4의 분자생물학적인 특성을 규명하기 위하여 baculovirus expression system을 이용하여 NSP4를 발현시켰다. 발현된 NSP4는 사람 로타바이러스 NSP4에 특이적인 단크론항체와 사람 로타바이러스 Wa strain에 특이적인 guineapig 항혈청을 사용한 간접형광 항체법과 Western blot으로 확인할 수 있었다. 간접형광 항체법 결과, NSP4 유전자가 삽입된 recombinant virus가 감염된 세포에서만 강한 형광을 관찰하였는데 이는 recombinant virus에 의해 발현된 NSP4가 NSP4에 특이적인 단크론항체와 반응하였기 때문이다. 또한 Western blot한 결과에서 보면 사람 로타바이러스에 감염된 MA104 세포 lysate에서는 발현된 NSP4를 관찰할 수 없었는데 이는 감염된 MA104 세포에서 생성된 NSP4의 양이 적은 것으로 생각된다. 하지만 recombinant virus가 감염된 Sf9 세포 lysate에서 발현된 NSP4는 크기를 달리하고 있는 것을 관찰할 수 있는데 이는 NSP4의 glycosylation 정도에 따라서 이와 같은 성상을 띠기 때문으로 생각된다. 즉, NSP4에 존재하는 2개의 glycosylation site 중 두 곳 모두에서 glycosylation이 일어나면 가장 크기가 큰 28 kDa의 NSP4가 되며 한 곳에서만 glycosylation이 되면 26 kDa의 NSP4, 마지막으로 어느곳 에서도 glycosylation이 일어나지 않으면 20 kDa의 NSP4가 되는 것이라고 보고 되어 있다³³. 추후 국내 사람 로타바이러스 NSP4에서의 병원성과 관련된 부위의 확인 및 생물학적인 특성을 규명하기 위해서는 germ free 동물을 이용한 생체 내 실험과 장 상피세포를 이용한 생체 외 실험 등이 이루어져야만 할 것으로 사료된다.

결 론

국내에서 어린 아이의 설사분변으로부터 분리한 혈청형이 서로 다른 4개의 사람 로타바이러스(CBNU/HR-1, CBNU/HR-2, CBNU/HR-3 그리고 CBNU/HR-4) NSP4 유전자에 대해 염기서열을 확인하여 이미 보고된 사람 및 동물 로타바이러스의 NSP4 유전자와 비교, 분석하였으며 NSP4의 분자생물학적인 특성을 규명하기 위해 baculovirus expression system을 이용하여 NSP4를 발현시켰다.

연구결과 사람 로타바이러스 국내분리주의 NSP4 유전자는 750 또는 751개의 염기로 구성되어 있으며 175개의 아미노산을 coding하는 하나의 open reading frame을 가지고 있고 2개의 glycosylation 부위가 존재함이 확인되었다. 또한 CBNU/HR-1, CBNU/HR-3, CBNU/HR-4의 NSP4 유전자는 genotype B에 속하나 CBNU/HR-2의 NSP4 유전자는 genotype A에 속하는 것으로 확인되었다. Baculovirus 발현체계를 이용하여 발현된 CBNU/HR-1의 NSP4는 형광항체법 및 Western blot법으로 특이적인 것으로 확인되었다.

본 연구에서 얻은 결과는 국내 사람 로타바이러스의 감염에 대한 이해와 NSP4 유전자의 분자생물학적 특성을 이해하는데 기초적인 자료가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol*, 105:123-184, 1983.
2. Flewett TH, Woode GN. The rotaviruses. Brief review. *Arch Virol*, 57:1-23, 1978.
3. Bridger JC. Novel rotaviruses in animals and man. *Ciba Found Symp*, 128:5-23, 1987.
4. Bican P, Cohen J, Charpilienne A, et al. Purification and characterization of bovine rotaviruses cores. *J Virol*, 43:1113-1117, 1982.
5. 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.
6. Cohen J, Charpilienne A, Chilmonczyk S, et al. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology*, 171:131-140, 1989.

7. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, 53:410-449, 1989.
8. Kirkwood CD, Palombo, EA. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology*, 236:258-265, 1997.
9. Hoshino Y, Sereno MM, Midthum K, *et al*. Independent segregation of two antigenic specificities(VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:8701-9704, 1985.
10. Offit PA, Blavat G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J Virol*, 57:376-378, 1986.
11. Ballard A, McCrae MA, Desselberger, U. Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses. *J Gen Virol*, 73:633-638, 1992.
12. Ball JM, Tian P, Zeng CQY, *et al*. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272:101-104, 1996.
13. Baybutt HN, McCrae MA. The molecular biology of rotaviruses. VII. Detailed structural analysis of gene 10 of bovine rotavirus. *Virus Res*, 1:533-541, 1984.
14. Both GW, Siegman LJ, Bellamy AR, *et al*. Coding assignment and nucleotide sequences of simian rotavirus SA11 gene segment 10: location of glycosylation sites suggests that the signal peptide is not cleaved. *J Virol*, 48:335-339, 1983.
15. Dong YJ, Zeng CQY, Ball JM, *et al*. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C mediated inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:3960-3965, 1997.
16. Tian P, Ball JM, Zeng CQY, *et al*. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* 70:6973-6981, 1996.
17. Tian P, Estes MK, Hu Y, *et al*. The rotaviral non-structural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 69:5763-5772, 1995.
18. Tian P, Hu Y, Schilling WP, *et al*. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol*, 68:251-257, 1994.
19. Zhang M, Zeng CQY, Dong Y, *et al*. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol*, 72:3666-3672, 1998.
20. Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, *et al*. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* 145:371-383, 2000.
21. Back MS, Kim WY, Kang SY. Cloning and sequencing of nonstructural protein(NSP4) gene of bovine rotavirus isolated in Korea. *J Kor Soc Virol*, 30:1-10, 2000.
22. Saif LJ, Rosen BI, Kang SY. Cell culture propagation of rotaviruses. *J Tissue Culture Methods*, 11:147-156, 1988.
23. 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.
24. Gouvea V, Glass RI, Woods P, *et al*. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 28: 276-282, 1990.
25. Chowdhury K. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 19:2792, 1991.
26. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495- 497, 1975.
27. 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 rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 27:2744-2750, 1989.
28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:4350-4354, 1985.
29. Horie Y, Masamune O, Nakagomi O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J Gen Virol*, 78:2341-2346, 1997.
30. Cunliffe NA, Woods P, Leite JPG, *et al*. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. *J Med Virol*, 53:41-50, 1997.
31. Au KS, Mattion NM, Estes MK. A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*, 194:665-673, 1993.
32. Bergmann CC, Maass D, Poruchynsky MS, *et al*. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein in

- NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 8:1695-1703, 1989.
33. Petrie BI, Estes MK, Graham DY. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. *J Virol*, 46:270-274, 1983.