

## Porcine circovirus 2 국내 분리주의 유전적 특성

박최규\* · 이경기 · 김현수<sup>1</sup>

국립수의과학검역원

<sup>1</sup>충남대학교 수의과대학

(게재승인: 2004년 10월 22일)

## Genetic characterization of porcine circovirus 2 Korean isolates

Choi-Kyu Park\*, Kyoung-Ki Lee and Hyun-Soo Kim<sup>1</sup>

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: October 22, 2004)

**Abstract :** In order to obtain the genetic informations of the Korean isolates of porcine circovirus 2 (PCV2), nucleotide sequences of total genome of three isolates and open reading frame 2 (ORF2) of four isolates were determined and compared with those of other reference PCV2 isolates. Nucleotide sequences of 3 isolates showed over 99% homology with those of reference strain (GenBank accession no. AF027217). Point mutations were mainly determined on ORF2 regions but little on ORF1 regions. The patterns of point-mutated sites and nucleotide substitution on ORF2 regions were generally consistent between Korean isolates, and these mutated sites observed in Korean isolates were also relatively similar to those of foreign isolates. Phylogenetic analysis of nucleotide or amino acid sequences showed that there were minor branches consisting of three clusters; cluster of Korea, Canada and America, cluster of Spain and Taiwan, and the last cluster of French and China isolates. These results suggested that Korean PCV2s were probably originated from North America such as Canada or USA. The genetic informations obtained from this study could be useful for the research of diagnosis and pathogenicity of PCV2.

**Key words :** postweaning multisystemic wasting syndrom(PMWS), porcine circovirus(PCV), nucleotide sequence, open reading frame(ORF), phylogenetic tree

### 서 론

Porcine circovirus(PCV)는 단쇄의 원형 DNA genome 을 가진 소형 nonenveloped virus로서 *Circoviridae*로 분류되고 있다 [14, 31]. *Circoviridae*에는 PCV 외에 동물 유래의 chicken anemia virus(CAV) [33] 및 psittacine beak and feather disease virus(PBFDV) [28]와 식물 유래의 subterranean clover stunt virus(SCSV) [7], banana bunchy top virus(BBTV) [13] 및 coconut foliar decay virus (CFDV) [29] 등이 있으며, 이 중 동물유래 3종의 circovirus 즉, PCV, CAV 및 PBFDV 간에는 서로 유전적, 항원적 연관성이 없는 것으로 알려져 있다 [6, 33].

최근에는 수혈성 간염(post-transfusion hepatitis)에 걸린 사람에게서 사람의 circovirus 즉, TT virus(TTV)가 동정된 바 있으며 [24, 27], 이 TTV는 CAV와 유전적 구성이 유사한 것으로 보고되고 있다 [24].

PCV는 돼지에서의 병원성 유무에 따라 돼지 신장세포주(PK-15, ATCC-CCL 33)에서 유래된 비병원성의 PCV1과 최근 전 세계적으로 발생하고 있는 이유자돈의 전신소모증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)의 1차적인 원인체인 PCV2로 구분하여 명명하고 있다 [2, 3, 21, 32]. PCV1과 PCV2 분리주들의 유전자염기서열 분석에 대한 여러 연구자들의 보고에 따르면 [12, 21, 23, 25] PCV1 분리주간

\*Corresponding author: Choi Kyu Park  
National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea  
[Tel: +82-31-467-1818, Fax: +82-31-467-1739, E-mail: parkck@nvrqs.go.kr]

또는 PCV2 분리주간에는 전체 유전자염기서열의 일치율이 90% 이상으로 높은 상동성을 보이고 있으나 PCV1과 PCV2 분리주간에는 68-76%의 일치율을 나타내어 이들 바이러스 간에 유전적 특성이 상이함을 보여주고 있다.

PCV1의 genome은 전체 1,759개의 핵산으로 구성되어 있으며, 5 kDa 이상의 단백질을 생성할 수 있는 7개의 open reading frame(ORF)이 복제형의 양 염기서열에서 확인된 바 있다 [20, 21]. 반면에 PCV2의 genome은 1,767-1,768개의 핵산으로 구성되어 있으며, 6개 또는 11개의 ORF가 존재함이 확인되었다 [10, 12, 23, 25]. 이 중 PCV의 증식과 주요 구조단백질의 조성에 관계하는 ORF1과 ORF2에 대한 유전자염기서열 분석결과, ORF1의 경우 PCV1과 PCV2 간의 염기서열과 아미노산배열의 일치율이 각각 83%와 86%로 두 바이러스 간에 항원적 연관성이 있음을 시사하고 있는 반면 ORF2의 경우에는 각각 67%와 65%의 일치율을 나타내고 있어 이러한 유전적 차이가 PCV1과 달리 PCV2가 병원성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다 [4, 17, 19, 26].

한편 각국의 PCV2 분리주간에는 90% 이상의 높은 유전자 일치율을 나타내고 있어 [5, 10, 23], 아직까지 새로운 genotype이 존재한다는 증거는 없다. 그러나 유럽, 북미, 아시아 등 서로 다른 지역에서 분리된 PCV2 분리주간에 일부 유전적 변이가 있는 것으로 보고되고 있으며 [12], 이러한 유전적 변이에 대한 정보는 PCV2 감염에 대한 진단, 병원성의 규명, 예방약의 개발 등 다양한 연구분야에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

국내에서도 PMWS 발병돈의 병변조직에서 PCV2의 감염이 확인되는 등 PMWS의 발병이 증가하고 있다 [9, 15, 16]. 그러나 아직까지 국내에서 발생하고 있는 PCV2에 대한 유전적 정보 등 원인체의 특성에 대한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 국내 양돈장의 PMWS 발병돈에서 분리된 PCV2 국내 분리주에 대한 유전자염기서열을 분석하여 그 정보를 제공하는 동시에 외국의 분리주와 비교분석하여 유전적 변이 여부를 조사함으로써 향후 PMWS 등 PCV2의 병원성 규명 등에 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스 및 세포

국내 분리주의 유전적 특성을 조사하기 위하여 박 등 [1]이 PMWS 감염 돈으로부터 분리한 분리주 7주를 공시하여 3주(PCK0101, PCK0201 및 PCK0203)는 전체 유전자염기서열을, 나머지 4주(PCK9901, PCK2K01,

PCK0102 및 PCK0202)는 ORF2 유전자염기서열을 분석하였다. PCV2의 배양은 PCV가 감염되지 않은 돼지 신장세포주(nPK-15 cell)를 이용하여 박 등 [1]의 방법에 따라 실시하였다. 즉, PCV2의 감염이 확인된 nPK-15 세포를 계대하여 37°C에서 1일간 배양하고, phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척한 다음, 300 mM D-glucosamine이 함유된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM, Gibco BRL, USA)을 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하였다. 처리 즉시 PBS로 세척하고 10% 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Moregate, USA)이 함유된 세포배양배지를 첨가하여 2일간 더 배양한 후에 세포를 수거하여 유전자염기서열 분석용 DNA 추출에 공시하였다.

세포배양배지는  $\alpha$ -MEM에 배지 1 ml 당 penicillin 100 IU, streptomycin 100  $\mu$ g 및 lactalbumin hydrolysate 0.25% 되게 첨가한 다음, 56°C에서 30분간 비동화한 FCS를 10% 되게 첨가하여 사용하였다.

### Primer 합성

PCV2 전체 유전자의 분석은 Hamel 등 [12]이 보고한 유전자염기서열(GenBank accession number AF027217)을 참고하여 PCR로 증폭된 각 유전자단편의 염기서열을 분석, 조합하여 전체 유전자염기서열의 분석이 가능하도록 8종의 primer pair를 합성하여 사용하였다(Table 1). 먼저 1, 6, 7 및 8번 primer pair를 이용하여 각각 PCR을 실시한 다음, 증폭된 DNA 단편들을 유전자염기서열 분석에 제공하였고, 4종의 primer pair에 의해 증폭된 DNA로 완전한 판독이 곤란할 경우에는 보조적으로 2, 3, 4 및 5번 primer pair로 증폭한 DNA 단편을 이용하여 추가로 염기서열을 분석하였다. ORF2 유전자염기서열 분석을 위한 DNA 증폭은 ORF2F/R primer pair를 합성하여 사용하였다(Table 1).

### PCV2 DNA 추출 및 PCR 증폭

Tissue DNA premate reagent(Bioneer, Korea) kit을 이용하여 PCV2 감염세포로부터 DNA를 추출하였으며, 추출한 DNA 10  $\mu$ l와 각 primer 1  $\mu$ l(50 pmol)를 PCR 반응액(AccuPower PCR Premix, Bioneer)에 첨가한 다음, PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 1차 반응시킨 다음, 94°C에 45초, 55°C에 45초 및 72°C에 1분씩 30회 반복하여 반응시킨 후 최종 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR로 증폭된 DNA는 각각 10  $\mu$ l 씩 취하여 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시한 다음, ethidium bromide 용액(0.5  $\mu$ g/ml)으로 염색하여 자외선 하에서 특이밴드를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다 [30].

**Table 1.** Primers for amplification of porcine circovirus 2 genes in nucleotide sequencing

Primer pairs		Nucleotide sequences (5'-3')	Position	Stranda
1 (433bp)	F	GCAGCACCTCAGCAGCAACA	32-51	V
	R	CTGCTCTGCAACGGTCACCA	464-445	C
2 (532bp)	F	TGGTGACCGTTGCAGAGCAG	445-464	V
	R	GGAAATTCAGGGCATGGGGG	976-957	C
3 (515bp)	F	GCTCTCTATCGGAGGATTAC	867-886	V
	R	GGCTCCACTGCTGTTATTCT	1381-1362	C
4 (493bp)	F	AGTGGAGTCAAGAACAGG	1226-1243	V
	R	GCGTTACCGCAGAAGAAGAC	1718-1699	C
5 (254bp)	F	CTTCTCCAACGGTAGCGGTG	1617-1636	V
	R	GTCCGCTTCTCCATTCTC	81-62	C
6 (677bp)	F	GGACGAACACCTCACCTCCA	207-226	V
	R	ATCCTCCGATAGAGAGCTTC	883-864	C
7 (656bp)	F	CTACTGAGACTGTGTGATCG	726-745	V
	R	GGCTCCACTGCTGTTATTCT	1381-1362	C
8 (778bp)	F	AGTGGAGTCAAGAACAGG	1226-1243	V
	R	GTCCGTCCTTCCTCATTACC	214-195	C
ORF2 (702bp)	F	ATGACGTATCCAAGGAGGCG	1735-1716	C
	R	TTAGGGTTTAAGTGGGGGGTC	1034-1055	V

<sup>a</sup>V, viral sequence; C, complementary sequence.

**Table 2.** Porcine circovirus 2 (PCV2) isolates used in comparison of nucleotide sequences

Type	Isolates	Geographic regions	Reference or source
PCV2	AF027217	USA (California)	Hamel <i>et al.</i> (1998) [12]
	AJ223185	USA (Iowa)	Morozov <i>et al.</i> (1998) [25]
	AF055392	Canada	Meehan <i>et al.</i> (1998) [23]
	AF201311	France	Mankertz <i>et al.</i> (2000) [18]
	AF201305	Germany	Mankertz <i>et al.</i> (2000) [18]
	AF201308	Spain	Mankertz <i>et al.</i> (2000) [18]
	AF538325	China	GenBank
	AF166528	Taiwan	GenBank
	AF544024	Korea	GenBank
	PCK9901 <sup>b</sup>	Korea	This study
	PCK2k01 <sup>b</sup>	Korea	This study
	PCK0101 <sup>a</sup>	Korea	This study
	PCK0102 <sup>b</sup>	Korea	This study
	PCK0201 <sup>a</sup>	Korea	This study
	PCK0202 <sup>b</sup>	Korea	This study
	PCK0203 <sup>a</sup>	Korea	This study

<sup>a</sup>PCV2 field isolates which were sequenced on entire genome.

<sup>b</sup>PCV2 field isolates which were sequenced on open reading frame 2 gene.

**유전자염기서열 및 아미노산 분석**

PCR로 증폭된 각 DNA는 GeneClean II kit(Bio101, USA)를 사용하여 정제한 다음, -20°C에 보관하면서 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열분석은 Taq Dye Primer Cycling kit(ABI, USA)와 ABI PRISM 377 sequencer(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 각각의 염기

서열을 판독한 다음, DNASIS 프로그램(Hitachi ver 2.5)으로 분석하였다. PCV2 국내 분리주 3주에 대한 전체 유전자염기서열은 Hamel 등 [12]이 보고한 염기서열과 비교·분석하였으며, 또한 이미 보고된 미국, 캐나다, 프랑스, 독일, 스페인 분리주 및 GenBank에 수록된 한국, 중국 및 대만 분리주 등 총 9주(Table 2)에 대한

phylogenetic tree를 작성하여 유전적 상관관계를 분석하였다. 아울러 PCV2의 유전자 중 비교적 변이가 심한 것으로 알려진 ORF2 유전자에 대해서는 국내 분리주 7주와 전술한 각국 분리주의 유전자염기서열과 아미노산서열을 비교분석하고, 각각 phylogenetic tree를 작성하여 유전적 상관관계를 분석하였다.

### 결 과

#### PCV2 유전자염기서열 분석

3종의 PCV2 국내 분리주(PCK0101, PCK0201 및 PCK0203)에 대한 전체 유전자염기서열을 분석하기 위하여 제작된 8종의 primer pair를 이용하여 PCR를 실시

하였고, 이들 증폭된 유전자단편의 염기서열을 분석한 후 DNASIS 프로그램으로 재배열하여 PCV2 국내 분리주에 대한 전체 유전자염기서열지도를 작성하였다(Fig. 1).

전체 유전자의 크기는 PCK0101주는 1,768개의 nucleotide로 구성되어 있고, PCK0201 및 PCK0203주는 ORF2 부위에 해당하는 1,335번째 염기서열에 1개의 nucleotide가 deletion되어 1,767개의 nucleotide로 구성되어 있었다. 3종의 국내 분리주간에는 전체 유전자염기서열 중 5개 부위에서 염기서열의 차이가 발견되었으나 전체적으로 99.5% 이상의 높은 일치율을 나타내었다.

분리주 3주의 유전자 염기서열을 AF027217 주 [11]와 비교한 결과, 각 분리주 별로 11-16개의 nucleotide가 point mutation되어 있는 것으로 확인되었다. ORF1에 해

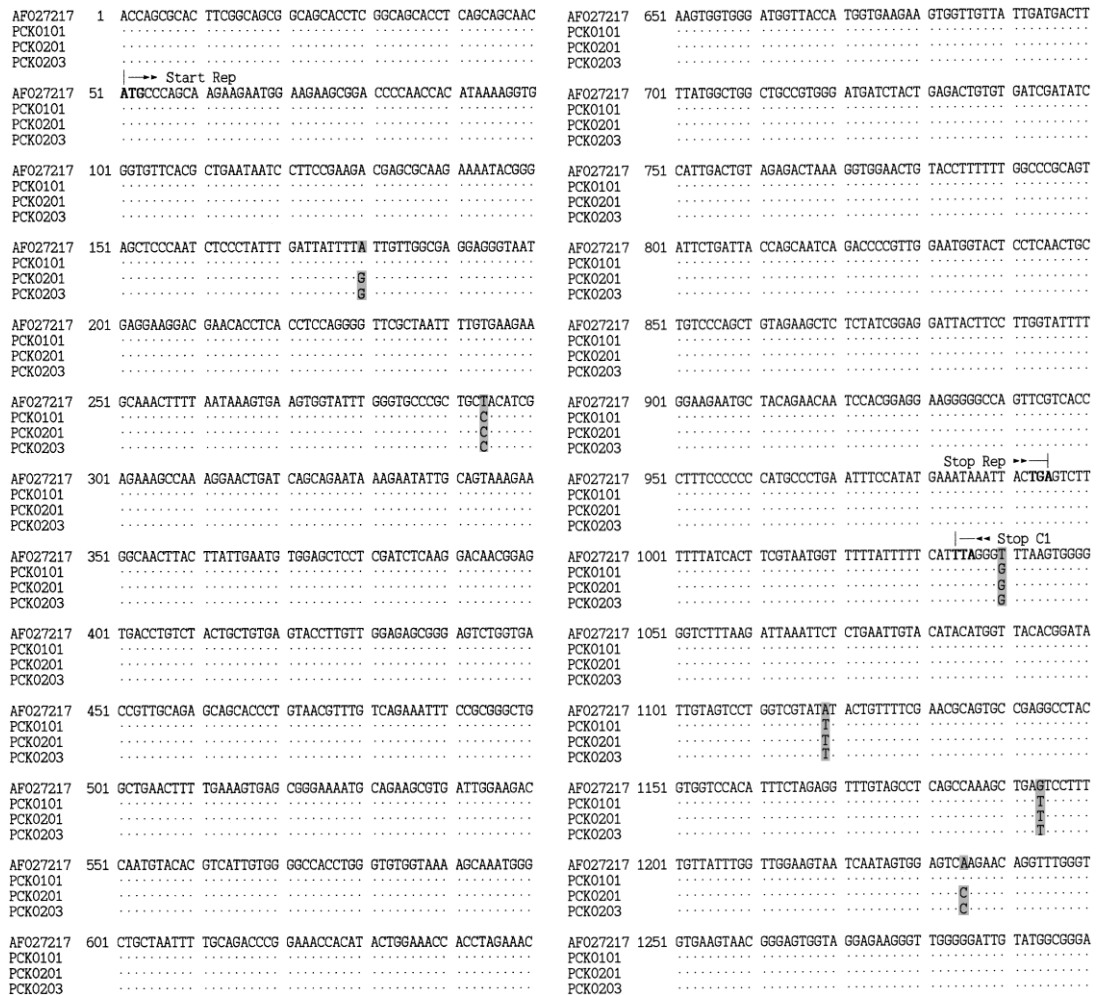


Fig. 1. Comparison of nucleotide sequences of porcine circovirus 2 Korean isolates and American isolate. Homologous nucleotides are indicated by dot. The start- and stop codons of two main ORFs (Rep and C1) are bold and double arrows indicate transcriptional direction.

AFO27217	1301	GGAGTAGTTT	ACATATGGGT	CATAGSITAG	GGCTGTGGCC	TTTGTTACAA
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1351	AGTTATCATC	TAGAATACA	GCAGTGGAGC	CCACTCCOCT	ATCACCCCTGG
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1401	GTGATGGGGG	AGCAGGGCCA	GAATCAACC	TTAACGTTTC	TTATTCTGTA
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1451	GTATTCAAAG	GGTATAGAGA	TTTGTGTGGT	CCCCCTCCC	GGGGGAACAA
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1501	AGTCGTCAGT	ATTAATCTC	ATCATGTCCA	CGGCCAGGA	GGGCGTTCG
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1551	ACTGTGTAGT	CCTTGACAGT	ATATCCGAAG	GTGCGGGAGA	GCGGGGTGTT
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1601	GAAGATGCCA	TTTTTCCTC	TCCACGCTA	GCAGTGGCGG	GGTGGACGA
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1651	GCCAGGGGCG	GCGGCGGAGG	ATCTGGCCAA	GATGGCTGCG	GGGCGGTGT
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1701	CITCTCTGTC	GGTAACGCCT	CCTTGGATAC	GTCATAGCTG	AAAACGAAAG
PCK0101		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0201		.....	.....	.....	.....	.....
PCK0203		.....	.....	.....	.....	.....
AFO27217	1751	AAGTGGCCTG	TAAGTATT			
PCK0101		.....	.....			
PCK0201		.....	.....			
PCK0203		.....	.....			

Fig. 1. Continued

당하는 염기서열(51-995 bp)의 경우는 180번 염기서열에서 2개 분리주(PCV0201 및 PCK0203)는 A가 G로 변이되었고, 294번 염기서열에서는 국내 분리주 3주 공히 G가 C로 point mutation되어 있었다. ORF2에 해당하는 염기서열(1029-1735 bp)의 경우는 각 분리주에 따라 10-14개의 point mutation이 확인되어 ORF1에 비해 다소 많은 변이가 관찰되었다.

각국의 PCV2 분리주와 국내 분리주 3주의 전체 유전자염기서열에 대한 phylogenetic tree를 작성하여 상관관계를 분석한 결과(Fig. 2), 국내 분리주는 캐나다 분리주 및 미국 분리주와 99% 수준으로 가장 밀접한 유전적 상관관계를 나타내었으며, 스페인, 독일 및 대만 분리주와는 97% 수준의 다소 낮은 상관관계를 나타내었다. 한편 프랑스 및 중국 분리주는 양국의 분리주간에는 99% 이상의 높은 상관관계를 나타내었으나 이들 양국분리주군과 국내 분리주군과는 94% 수준의 비교적 낮은 상관관계를 나타내었다.

**PCV2 ORF2 유전자염기서열 및 아미노산 분석**

국내 분리 PCV2 7주의 ORF2 유전자염기서열을 분석한 결과, 국내 분리주간에 일부 deletion 및 point

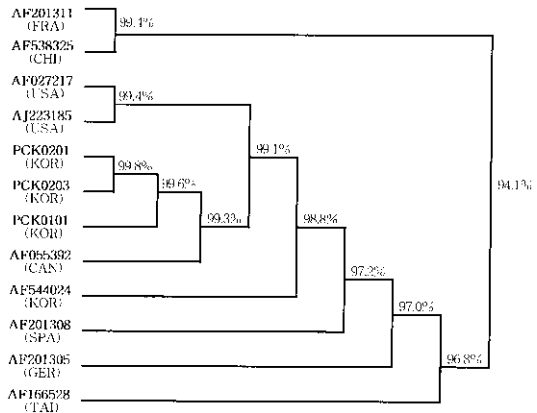


Fig. 2. Phylogenetic tree based on the total nucleotide sequences of porcine circovirus 2 genome. Abbreviations indicating geographic locations are as follows; FRA: France, CHI: China, SPA: Spain, TAI: Taiwan, KOR: Korea, CAN: Canada, GER: Germany.

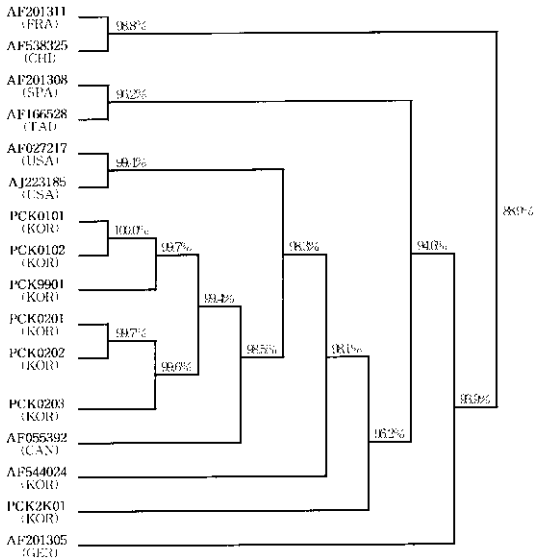
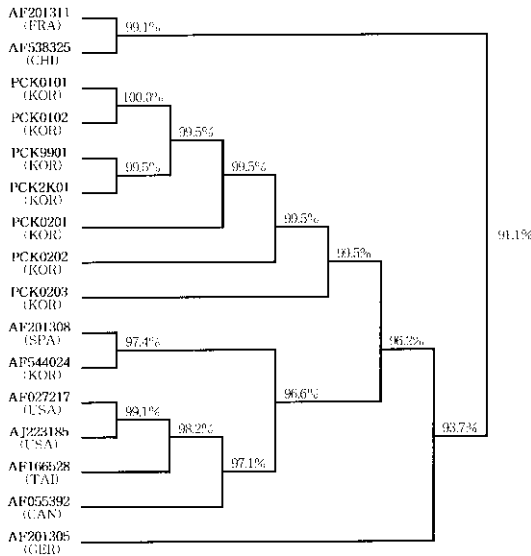


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the open reading frame 2 nucleotide sequences of porcine circovirus 2 isolates. Abbreviations indicating geographic locations are as follows; FRA: France, CHI: China, SPA: Spain, TAI: Taiwan, KOR: Korea, CAN: Canada, GER: Germany.

mutation에 의한 상이한 nucleotide가 관찰되었으나 99% 이상의 높은 일치율을 나타내었다. 국내 분리주의 유전자염기서열 중 point mutation된 nucleotide의 위치나 종류는 대체적으로 일치하는 양상을 보였으며, 외국 분리주의 point mutation 양상과도 비교적 유사한 경향을 나타내었다. PCV2 분리주간의 유전적 상관관계를 알아보



**Fig. 4.** Phylogenetic tree based on amino acid sequences of the open reading frame 2 of porcine circovirus 2 isolates. Abbreviations indicating geographic locations are as follows; FRA: France, CHI: China, SPA: Spain, TAI: Taiwan, KOR: Korea, CAN: Canada, GER: Germany.

기 위하여 본 연구에서 분석한 국내 분리주 7주와 기준에 보고된 미국 분리주 2주 [12, 25], 캐나다 [22], 프랑스, 독일 및 스페인 분리주 각 1주 [18] 및 GenBank로부터 입수한 중국, 대만 및 한국 분리주의 ORF2 유전자염기서열에 대하여 phylogenetic analysis를 실시하였다(Fig. 3). 국내 분리주 7주와 미국-캐나다 분리주간에는 96-100%의 일치율을 나타내어 유전적 상관관계가 매우 높았으나, 스페인-대만 분리주 및 독일 분리주는 국내 분리주군과 94.6% 및 93.9%로 비교적 낮은 상관관계를 나타내었으며, 프랑스-중국 분리주군과는 더 낮은 89% 수준의 상관관계를 나타내었다. 그러나 스페인과 대만 분리주 또는 프랑스와 중국 분리주간에는 각각 96% 또는 98% 이상의 상관관계를 나타내어 국가별로 분리주간에 일부 minor branch가 존재하는 것으로 확인되었다. ORF2 아미노산 서열 분석결과도 일부 분리주간에 상동성에 다소 차이가 있을 뿐 유전자염기서열 분석결과와 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 4).

## 고 찰

PCV2 국내 분리주의 유전적 특성과 외국 분리주와의 상관성 여부를 알아보기로 하자 PMWS 발병돈의 조직시료에서 분리한 PCV2에 대한 유전자염기서열 분석을 실시하였다. 즉, 국내 분리주 7주중 3주(PCK0101, PCK0201 및

PCK0203)는 전체 유전자 염기서열을, 나머지 4주(PCK9901, PCK2K01, PCK0102 및 PCK0202)는 분리주간에 비교적 변이가 심한 것으로 알려진 ORF2에 대한 유전자염기서열을 분석하여 그 결과를 각국의 PCV2 분리주의 유전자염기서열(Table 2)과 비교분석하였다.

전체 유전자염기서열을 분석한 3종의 국내 분리주는 1,767개(PCK0201 및 PCK0203) 및 1,768개(PCK0101)의 nucleotide로 구성되어 있었다. 또한 ORF2 유전자염기서열을 분석한 국내 분리주 4주 중 2주(PCK2K01 및 PCK0102)는 deletion된 부위가 없어 1,768개의 nucleotide로, 나머지 2주(PCK9901 및 PCK0202)는 동일한 부위에서 1개의 nucleotide가 deletion되어 있어 이들은 1,767개의 nucleotide로 구성되어 있을 것으로 판단되었으며, 이러한 양상은 각국의 PCV2 분리주의 유전자염기서열을 비교분석한 Fenaux 등 [11]의 성적과도 일치하였다.

ORF1의 염기서열은 국내 분리주간에 99% 이상의 높은 일치율을 나타내었으며, 미국 분리주(AF027217)와는 2개 염기서열위치(180 및 294번 염기서열)에서 point mutation이 확인되었으나 역시 99% 이상의 일치율을 나타내어 매우 안정된 양상을 나타내고 있었다. 이는 PCV2의 ORF1은 바이러스의 증식에 필수적인 replication-associated protein을 구성하고 있으므로 안정성이 높다는 보고 [21, 22]와 일치하는 것이다. 또한 최근 PMWS와 질병의 양상이 구별되는 돼지피부염 및 신증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) 발병 예에서 분리된 PCV2의 경우도 ORF1의 염기서열은 PMWS 관련 PCV2 분리주와 높은 일치율을 나타내고 있다는 보고 [22]와 본 논문의 국내 분리주의 염기서열 분석 결과에서 ORF1의 염기서열이 매우 안정적임을 고려할 때 ORF1의 유전적 차이가 PCV2의 병원성 차이 등에 영향을 미칠 가능성은 매우 낮은 것으로 생각된다.

국내 분리주 7주에 대한 ORF2에 대한 유전자염기서열 분석결과, 국내 분리주간에는 98% 이상의 높은 일치율을 나타내었고, 미국 분리주(AF027217)와도 97% 수준으로 일치하였다. 그러나 AF027217의 유전자염기서열과 비교한 결과, 각 분리주에 따라 9-13개의 point mutation을 확인할 수 있었으며, 변이된 염기서열위치로 볼 때 9개 염기서열 위치 즉, ORF2 유전자 염기서열 시작부위로부터 7번(T→G), 86번(A→T), 161번(G→T), 312번(T→G), 477/478번(T/A→G/C), 515번(C→G) 및 517/518번(G/C→C/G) 염기서열 위치에서는 국내 분리주 7주가 동일하게 변이된 것으로 확인되어 이 부위의 변이는 국내 분리주간의 공통적인 변이로 판단되었다. 또한 분리주에 따라 202번(A→C)은 7주 중 4주, 302번(G→deletion)은 7주 중 5주, 334번(A→G)은 7주 중 3주, 403번(C→T)은 7주 중 2주 및 661번(G→A)은 7주 중 5주

에서 염기서열의 변이가 관찰되는 등 다양한 변이양상을 나타내었다. 또한 변이양상을 외국의 분리주와 비교한 결과, 국내 분리주의 변이가 발생한 부위에는 외국분리주 중 2개 이상의 분리주가 변이를 보이고 있는 부위임이 확인되어 PCV2 ORF2 유전자염기서열의 변이가 비교적 일정한 부위에서 이루어지는 것으로 추정되었다.

PCV2의 주요 구조단백질을 구성하고 있는 ORF2는 PCV2의 ORF 중에서 가장 변이가 심한 것으로 알려져 있고 [11, 12, 18], 이러한 ORF2의 변이가 PCV2의 숙주 동물에 대한 병원성과 연관이 있다는 견해가 일부 연구자에 의해 제기되고 있다 [18, 22]. Feline parvovirus와 같은 소형 DNA 바이러스의 경우에는 일부 유전자 염기서열의 point mutation에 따른 1-2개의 아미노산조성의 변이가 감수성동물조차 고양이에서 개로 변화시킬 정도로 바이러스의 병원성에 결정적인 영향을 미칠 수 있음을 보고하고 있다 [8]. 이러한 보고로 보아 PCV2 역시 소형 DNA 바이러스로서 ORF2 염기서열에 있어 소수의 point mutation이 병원성에 결정적인 영향을 미칠 가능성이 높으며, 이러한 변이가 국내에서 발생하고 있는 PMWS의 병원성이나 임상증상의 다양성과 연관이 있을 것으로 판단되나 이에 관해서는 향후 더 구명되어야 할 것으로 생각된다.

국내 분리주 7주와 각국의 분리주의 ORF2 유전자염기서열을 비교하여 phylogenetic analysis로 유전적 상관관계를 분석한 결과, 한국·미국·캐나다 분리주군, 독일 분리주, 스페인·대만 분리주군 및 프랑스·중국 분리주군으로 유전적 상관관계가 구분되는 일종의 minor branch가 존재하는 것으로 나타났으며(Fig. 3), 이러한 양상은 ORF2의 아미노산 서열 분석결과에서도 동일하게 확인되었다(Fig. 4). 이는 Fenaux 등 [11]이 각국의 PCV2 분리주에 대한 유전자염기서열을 비교분석한 결과, 각 지역별 분리주간에 유전적 차이에 따른 여러 종의 minor branch가 존재하며, 특히 프랑스 분리주의 경우 다른 분리주들과 뚜렷히 구분된다는 보고와 일치하였다. 본 논문에서 분석한 각국의 분리주간의 유전적 상관관계는 국가간 돼지의 교역상황과 밀접한 연관성이 있을 것으로 추정되나 더욱 정밀한 역학적인 분석이 필요할 것으로 생각된다. 한편 본 논문에서 분석한 PCV2 국내 분리주의 유전자염기서열 정보는 PCR과 같은 PCV2 감염증의 유전자진단에 있어 primer 작성 등에 중요한 정보가 될 것으로 판단되며, 향후 PCV2 감염증에 대한 병원성의 규명 등에도 활용가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

## 결 론

PMWS 특이증상을 보이는 국내 양돈장의 돼지로부터

분리된 PCV2 국내 분리주 7종에 대한 유전자 염기서열을 분석하였다. 3종의 국내 분리주(PCK0101, PCK0201 및 PCK0203)에 대한 전체 유전자염기서열을 분석한 결과, 국내 분리주간에는 99.5% 이상의 높은 일치율을 나타내었으며, 미국분리주(AF027217)와도 99% 이상의 높은 일치율을 나타내었다. 국내 분리주의 유전자염기서열을 미국 분리주(AF027217)와 비교했을 때 각 분리주에 따라 11-16개 부위의 point mutation된 부위가 전체 유전자염기서열에서 확인되었다. 이러한 변이는 ORF1 유전자보다는 ORF2 유전자에서 주로 관찰되었으며, ORF2 유전자염기서열의 변이된 위치나 핵산은 국내 분리주간에 대체적으로 일치되는 양상을 나타내었으며, 해당 변이부위는 외국의 분리주에서도 흔히 변이가 관찰되는 부위로 확인되었다.

국내 분리주 7주와 각국 분리주의 ORF2 유전자염기서열 및 아미노산서열에 대하여 phylogenetic analysis로 유전적 상관관계를 분석한 결과, 한국·미국·캐나다 분리주군, 독일분리주, 스페인·대만분리주군 및 프랑스·중국 분리주군 등과 같이 유전적 상관관계가 다소 상이한 minor branch가 존재하는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과로 미루어 볼 때 한국의 PCV2는 북미에서 유래되었을 가능성이 높은 것으로 추정된다. 이 연구를 통하여 얻어진 PCV2 국내 분리주의 유전적 정보는 향후 진단 방법개발이나 병원성 규명 등에 유용할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 박희규, 김현수. 이유자돈 전신소모증후군 이환 자돈에서의 바이러스성 원인체 검색 및 porcine circovirus 2 분리동정. 대한수의학회지. 2004, 44, 561-569.
2. Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E. G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A. and Charreyre, C. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. Vet. Rec. 1998, 142, 467-468.
3. Allan, G. M. and Ellis, J. A. Porcine circoviruses: a review. J. Vet. Diagn. Invest. 2000, 12, 3-14.
4. Allan, G. M., McNeilly, F., Cassidy, J. P., Reilly, G. A., Adair, B., Ellis, W. A. and McNulty, M. S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 1995, 44, 49-64.
5. Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. and Adair, B. M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J. Vet. Diagn. Invest. 1998, 10, 3-10.

6. **Bassami, M. R., Berryman, D., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R.** Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*. 1998, **249**, 453-459.
7. **Boevink, P., Chu, P. W. and Keese, P.** Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology*. 1995, **207**, 354-361.
8. **Chang, S. F., Sgro, J. Y. and Parrish, C. R.** Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J. Virol.* 1992, **66**, 6858-6867.
9. **Choi, C. and Chae, C.** In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 1999, **121**, 265-270.
10. **Ellis, J., Hassard, L., Clark, W., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. and Haines, D.** Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 1998, **39**, 41-51.
11. **Fenaux, M., Halbur, P. G., Gill, M., Toth, T. E. and Meng, X. J.** Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 2494-2503.
12. **Hamel, A. L., Lin, L. L. and Nayar, G. P.** Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multi-systemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 1998, **72**, 5262-5267.
13. **Harding, R. M., Burns, T. M. and Dale, J. L.** Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J. Gen. Virol.* 1991, **72**, 225-230.
14. **Lukert, P., de Boer, G. F. and Dale, J. L.** The Circoviridae. *In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., eds. Virus Taxonomy. 6th Rep. Int. Committee Taxon. Viruses.* pp. 166-168, Vienna: Springer-Verlag, 1995.
15. **Lyoo, K. S., Park, Y. H. and Park, B. K.** Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J. Vet. Sci.* 2001, **2**, 201-207.
16. **Lyoo, Y. S., Kim, J. H. and Park, C. K.** Identification of porcine circoviruses with genetic variation from lymph nodes collected in pigs with PMWS. *Kor. J. Vet. Sci.* 1999, **39**, 353-358.
17. **Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E. and Jestin, A.** Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 2000, **81**, 1815-1824.
18. **Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J. M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Planaduran, J. and Soike, D.** Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 2000, **66**, 65-77.
19. **Mankertz, A., Mankertz, J., Wolf, K. and Buhk, H. J.** Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J. Gen. Virol.* 1998, **79**, 381-384.
20. **Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G. and Buhk, H. J.** Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* 1997, **71**, 2562-2566.
21. **Meehan, B. M., Creelan, J. L., McNulty, M. S. and Todd, D.** Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 1997, **78**, 221-227.
22. **Meehan, B. M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J. A., Krakowka, S. and Allan, G. M.** Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch. Virol.* 2001, **146**, 835-842.
23. **Meehan, B. M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V. A., Ellis, J. A., Hassard, L. E., Clark, E. G., Haines, D. M. and Allan, G. M.** Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 1998, **79**, 2171-2179.
24. **Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. and Hino, S.** Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.* 1999, **73**, 3582-3586.
25. **Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K. J. and Paul, P. S.**



- Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2535-2541.
26. **Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S. R., Harms, P. A., Sorden, S. D. and Paul, P. S.** Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 2000, **81**, 2281-2287.
27. **Nishizawa, T., Okamoto, H., Konoshi, K., Yoshizawa, H., Miyazawa, Y. and Mayumi, M.** A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, **241**, 92-97.
28. **Ritchie, B. W., Niagro, F. D., Latimer, K. S., Lukert, P. D., Steffens, W. L. 3rd, Rakich, P. M. and Pritchard, N.** Ultrastructural, protein composition, and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *J. Wildl. Dis.* 1990, **26**, 196-203.
29. **Rohde, W., Randles, J. W., Langridge, P. and Hanold, D.** Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology.* 1990, **176**, 648-651.
30. **Sambrook, J. F., Russell, D. W. and Irwin, N.** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000.
31. **Tischer, I., Geldblom, H., Vettermann, W. and Koch, M. A.** A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.* 1982, **295**, 64-66.
32. **Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M. and Griem, W.** Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 1986, **91**, 271-276.
33. **Todd, D., Niagro, F. D., Ritchie, B. W., Curran, W., Allan, G. M., Lukert, P. D., Latimer, K. S., Steffens, W. L. and McNulty, M. S.** Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch. Virol.* 1991, **117**, 129-135.