

조류 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열분석 및 발현

신인호 · 이승철 · 김원용¹ · 강신영*

충북대학교 수의과대학 동물의학연구소

¹중앙대학교 의과대학

(게재승인: 2005년 5월 27일)

Nucleotide sequence analysis and expression of NSP4 gene of avian rotavirus

In-ho Shin, Seung-chul Lee, Won-yong Kim¹, Shien-young Kang*

Research Institute of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹College of Medicine, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

(Accepted: May 27, 2005)

Abstract : The nonstructural protein 4 (NSP4) of rotavirus encoded by gene 10, plays an important role in rotavirus pathogenicity. In this study, NSP4 gene of avian rotavirus (AvRV-1, AvRV-2) was analyzed and expressed using baculovirus expression system. The sequence data indicated that the NSP4 gene of AvRV-1 and AvRV-2 were 727 bases in length, encoded one open reading frame of 169 amino acids beginning at base 41 and terminating at base 550, and had two glycosylation sites. Nucleotide sequences of NSP4 gene of AvRV-1 and AvRV-2 exhibited a high degree of homology (88.1±7.6%) with avian rotaviruses, namely Ty1, Ty3 and PO-13. Phylogenetic analysis showed that AvRV-1 and AvRV-2 belonged to genotype NSP4[E], which is widely found in group A avian rotaviruses. The baculovirus-expressed NSP4 migrated at 20-28 kDa and reacted with NSP4-specific antiserum by FA and Western blot. Furthermore, it was found to be a glycoprotein by using tunicamycin, which is a specific inhibitor of N-linked glycosylation.

Key words : avian rotavirus, NSP4, sequence, expression

서 론

Reoviridae 과에 속하는 로타바이러스는 조류를 포함하여 어린 동물에서 설사를 일으키는 원인으로 알려져 있다 [5, 12]. 로타바이러스는 피막이 없으며 직경 75 nm의 정이십면체 형태로 3겹의 캡시드 단백질, 즉 외피, 내피 및 핵심으로 되어 있다. Genome은 11개 분절의 dsRNA로 구성되며 [11, 12], 각각의 분절은 6개의 구조 단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 5개의 비구조 단백질(NSP1~NSP5)을 지배한다 [6, 11]. 로타바이러스는 항원분석에 따라 혈청군(serogroup), 아군(subgroup) 및

혈청형(serotype)으로 구분되며 혈청군은 군 특이 단백질 VP6에 기초하여 7개의 그룹(A~G)으로 분류된다 [5, 12, 21]. 현재 조류 로타바이러스는 그룹 A와 D로 제한되어 있으며, 이 중에서도 그룹 A에 속하는 로타바이러스가 닭, 칠면조를 포함한 조류에서 감염을 일으키는 주요한 원인으로 알려지고 있다 [9, 19].

조류 로타바이러스 감염증은 Bergeland 등에 의해 어린 칠면조 분변에서 최초로 바이러스가 분리 보고된 후 [4], 전 세계적으로 칠면조, 닭, 오리, 비둘기 등에서 발생하고 있다. 로타바이러스에 의한 설사는 보통 장 상피 세포의 파괴로 인한 이차적인 흡수불량과 상피세포 간

이 논문은 2004학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

*Corresponding author: Shien-young Kang

Research Institute of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[Tel: +82-43-261-2598, Fax: +82-43-267-3150, E-mail: sykang@chungbuk.ac.kr]

세포액 균형의 변화 그리고 국소적인 용모 허혈 등에 의해 유도되는 것이 지금까지 알려진 일반적인 기전이었다. 그러나 최근에 NSP4가 칼슘의존 신호전달 경로에 의한 chloride 분비를 야기 시키는 장관독소(enterotoxin)로 작용하여 바이러스의 병원성에 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌으며 [25, 27, 28], Ball 등 [3]은 순수 분리한 NSP4와 *in vitro*에서 합성된 22개의 아미노산으로 구성된 펩티드(114-135 aa)가 6-10일령의 마우스에서 설사를 유발함을 보고하였다. NSP4는 다른 세균의 장관독소와 같이 장관 내에 존재하는 특이 수용체와 결합하여 cAMP 또는 cGMP를 증가시키고 cyclic nucleotide 신호전달경로를 활성화하여 Cl⁻의 분비를 증가시키는 반면 Na⁺와 물의 흡수는 감소시키는 기전에 의하여 설사를 유도한다 [10, 26].

국내에서 조류 로타바이러스와 로타바이러스 NSP4 유전자에 대한 연구는 매우 미진하다. 강 등 [1]이 조류 group A 로타바이러스에 대한 병원성을 보고하였고 조류 로타바이러스에 대한 단크론항체를 생산하여 이들의 특성을 규명하였으며 [17], 백 등 [2]은 국내 소 로타바이러스 NSP4 유전자 염기서열을 분석하고 baculovirus expression system을 이용하여 발현시켜 특성을 분석하였다.

본 연구에서는 조류 로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열을 비교 분석하고, 병원성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 NSP4의 분자생물학적인 특성을 규명하기 위해 baculovirus expression system을 이용하여 발현시키고 Western blotting을 실시하여 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

바이러스

본 실험에서 사용된 조류 로타바이러스 AvRV-1, AvRV-2는 미네소타주립대학교의 Dr. Nagaraja KV로부터 분양받은 것으로 MA104 세포를 이용하여 배양하였다.

바이러스 RNA 추출

조직배양에서 증식한 바이러스 배양액을 3회 동결 해동한 후 배양액 600 µl에 0.1 volume의 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 2 M sodium acetate 30 µl을 넣고 동량의 phenol을 넣어 잘 섞은 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액에 phenol-chloroform을 넣어 잘 섞은 후 원심 분리하여 조심스럽게 취한 상층액에 3M sodium acetate와 isopropyl alcohol을 넣어 가볍게 섞은 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 70% 에탄올로 2회 세척하였다. Pellet은 원심진공농축기(Spinvac,

Hanil Corp.)로 건조시키고 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma) 처리된 증류수로 용해한 후 RNAaid[®] kit(BIO 101)를 이용하여 정제하였다. 정제한 RNA는 DEPC water에 용해하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

RT-PCR(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

NSP4 유전자를 증폭하기 위한 forward primer(5'-GGCTTAAAAACTCAATATC-3')와 reverse primer(5'-GGTCATATAAACCCAACACTA-3')는 비둘기 유래 PO-13 (GeneBank accession number: AB009627)을 기초로 하여 727 bp의 NSP4 유전자 전체를 증폭할 수 있도록 제작하였다. RT-PCR은 추출한 RNA 10 µl에 1 µl의 reverse primer를 넣고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치한 후 DEPC 처리된 증류수 20 µl, 5× first strand buffer 10 µl, 0.1 M DTT 5 µl, 10 mM dNTP 2 µl, RNase inhibitor 1 µl, reverse transcriptase(200 U/µl) 1 µl을 순서대로 넣어 37°C에서 60분간 반응시켜 cDNA 합성을 하였다. 합성된 cDNA template 10 µl에 DEPC 처리된 증류수 63 µl, 10× PCR buffer 10 µl, 25 mM MgCl₂ 12 µl, 10 mM dNTP 2 µl, forward primer 1 µl, reverse primer 1 µl, Taq DNA polymerase(5 U/µl) 1 µl를 넣어 95°C, 5 min, 25 cycles의 94°C/45 sec, 43°C/45 sec, 72°C/1 min 그리고 72°C, 7 min의 반응을 핵산증폭기(GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer)에서 실시하였다. 반응 산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 1 kb DNA ladder(Gibco BRL)와 비교하여 크기를 확인하였다.

cDNA 크로닝 및 염기서열 분석

NSP4 PCR 산물의 크로닝은 pGEM[®] T easy vector system(Promega)를 사용하여 실시하였다. 재조합 클론으로부터 플라스미드 추출은 one step plasmid mini-preparation 방법을 사용하였으며 [7], *EcoRI*(10 U/µl, Gibco BRL)으로 37°C에서 1시간 반응하고 1% agarose gel 상에서 전기영동 하여 insert의 삽입 유무와 크기를 확인하였다. NSP4 유전자의 염기서열 결정은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)으로 반응한 후 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 분석한 유전자 염기서열은 Clustal_X(1.7) program [24]을 이용하여 GeneBank에 수록된 그룹 A 로타바이러스들의 NSP4 유전자 염기서열과 유사성 행렬을 구하였다. 이 연구에서 비교한 serogroup A 로타바이러스들은 총 17주로 다음과 같다; Human KUN(D88829), Simian SA11 (AF087678), Rabbit ALA(AF144792), Bovine NCVP5

(X06806), Equine H-2(AF144801), Equine H-1(AF144800), Porcine OSU(D88831), Human Wa(AF093199), Human AU-1(D89873), Canine CU-1(AF144806), Feline FRV-1(D89874), Murine EHP(U96336), Murine EW(U96335), Pigeon PO-13(AB009627), Turkey Ty-1(AB065285), Turkey Ty-3(AB065286), Chicken Ch-1(AB065287). 다중 정렬한 염기서열은 PHYLIP package [14]를 이용하여 계통수를 작성하였으며 유전적 계통도(phylogenetic tree)는 neighbour-joining algorithm [23]을 이용하여 추론하였고 진화적 거리 행렬은 Jukes와 Cantor의 distance model [16]을 이용하여 구하였다. 작성한 tree의 위상은 PHYLIP package의 SEQBOOT과 CONSENSE option을 이용하여 neighbour-joining method의 1,000회 resampling을 통한 bootstrap 분석으로 평가하였다 [13]. Out group으로는 serogroup B 로타바이러스 Human ADRV(AY548957)와 serogroup C 로타바이러스 Porcine Cowden (AF093202)를 사용하였다.

Baculovirus expression system을 이용한 NSP4 유전자 발현

(1) Transfection

Baculovirus expression vector인 pBacPAK8(Clontech)에 NSP4 유전자를 삽입하여 발현 vector pBacPAK8-NSP4를 제작하고 BacPAK™ transfection kit(Clontech)를 이용하여 제조사의 술식에 의하여 Sf21 cell에서 cotransfection을 실시하였다.

(2) 다가 항체의 생산

조류 로타바이러스의 특이 다가 항체를 생산하기 위하여 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% Na₃N)로 용해한 후 원심한 바이러스 상층액과 Freund's complete adjuvant(Gibco BRL)를 동량으로 섞어서 BALB/c 마우스에 복강으로 1차 접종하였다. 2차와 3차는 각각 접종 2주 후에 Freund's incomplete adjuvant를 항원과 동량으로 섞어서 복강으로 접종하였다. 마지막 복강 접종 2주후에 BALB/c 마우스로부터 항혈청을 얻어 AvRV-1 특이 다가 항체로 사용하였다.

(3) 간접형광항체법

Recombinant virus가 NSP4를 발현하는가를 확인하기 위하여 간접형광항체법을 사용하였다. 즉 Sf21 cell이 배양된 96-well plate에 recombinant baculovirus를 접종하여 48시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하였다. 1차 항체로 로타바이러스 NSP4에 특이적인 항혈청을 1:100으로 희석하여 100 µl 씩 넣어 37°C에서 1시간 반응 후

phosphate buffer saline(PBS)로 5회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:100으로 희석하여 100 µl 씩 넣어 1시간 배양 후 PBS로 5회 세척한 뒤 mounting buffer를 넣어 형광현미경으로 관찰하였다.

(4) Western blotting

Recombinant virus를 접종하여 27°C에서 48시간동안 배양하여 수확한 Sf21 cell을 SDS-PAGE 및 Western blot의 샘플로 사용하였다. 또한 tunicamycin의 효과를 알아보기 위해 recombinant virus를 cell에 접종 후 tunicamycin을 처리한 것과 처리하지 않은 것, 그리고 recombinant virus를 접종하지 않은 Sf21 cell 모두를 수확하여 원심 분리한 후 얻은 상층액과 pellet을 샘플로 사용하였다. 각각의 cell pellet은 lysis buffer로 처리한 후 원심 분리하여 상층액을 취하고 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 끓여 변성시켰다. 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 담군 후 nitrocellulose membrane(NEN™ Life Science Products)로 semi-trans-blot(Bio-rad)을 이용하여 13 volt로 20분간 전이시켰다. Nitrocellulose membrane은 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(TBS; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)에서 하룻밤 동안 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 제조한 NSP4 특이 항혈청을 사용하여 1시간동안 실온에서 흔들며 반응 시킨 후 TBS로 3회 세척하였으며 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2000 희석하여 1시간 반응 시킨 뒤 이를 다시 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로는 NBT/BCIP stock solution(Boehringer mannheim) 200 µl을 alkaline phosphatase buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) 10 ml에 섞어 사용하였다.

결 과

로타바이러스 RNA 추출 및 RT-PCR

조류 로타바이러스 AvRV-1과 AvRV-2의 RNA를 추출하여 전기영동을 한 결과 로타바이러스 특유의 11개 분절로 된 RNA를 관찰할 수 있었으며, 추출된 RNA를 NSP4 primer set을 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 727 bp 크기의 NSP4가 증폭되었음을 확인할 수 있었다.

NSP4 유전자 염기서열분석

조류 로타바이러스 AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4와 Serogroup A 로타바이러스들의 NSP4와 유전적 상관성을 알아보기 위하여 NSP4 유전자의 염기서열을 비교 분석하였다. AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4 유전자는 727개의 염기로 구성되며 두 개의 glycosylation site(62-71 nt, 89-97 nt)가 존재함을 확인하였다. 아미노산 서열을 추정할 결과 AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4 유전자는 염기서열 41에서 시작하여 550을 끝으로 169개의 아미노산을 encode 하는 한 개의 open reading frame이 존재하고 있음을 확인하였다.

AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4 유전자의 염기서열은 서로 97.4%의 상동성을 보였으며, GenBank에서 등록된 그룹 A 로타바이러스들의 NSP4 유전자 염기서열과 비교 분석한 결과, 상동성의 범위는 48.4%에서 98.3%로 나타났다. 가장 높은 상동성은 NSP4[E]에 속하는 칠면조 유래주인 Ty-3(AvRV-1: 98.3%, AvRV-2: 97.7%)에서 나타났으며, 가장 낮은 상동성은 NSP4[C]에 속하는 개 유래주인 CU-1(AvRV-1: 48.5%, AvRV-2: 48.4%)에서 나타났다. 각 NSP4 유전자형과의 비교에서는 AvRV-1과 AvRV-2는 NSP4[E]에 속하는 pigeon PO-13, turkey Ty-1, turkey Ty-3와 88.1±7.6%, NSP4[F]에 속하는 chicken Ch-1과 78.5±0.1%, NSP4[B]에 속하는 equine H-1, porcine OSU, human Wa와 49.8±0.8%, NSP4[A]에 속하는 human KUN, simian SA11, rabbit ALA, bovine NCV5, equine H-2와 49.8±0.5%, NSP4[C]에 속하는 human AU-1, canine CU-1, feline FRV-1와 51.6±2.4%, NSP4[D]에 속하는 murine EHP, murine EW와 49.3±0.2%의 상동성을 보였다. 대조 바이러스로 사용한 serogroup B 로타바이러스인 human ADRV와는 39.2±0.2%, serogroup C 로타바이러스인 porcine Cowden과는 36.2±0.4%의 매우 낮은 상동성을 보였다.

다중 정렬한 염기서열로부터 Neighbour-joining algorithm을 이용하여 유전적 계통도를 작성한 결과는 Fig. 1과 같다. 각 유전형에 속하는 바이러스들은 동일 그룹을 형성하였으며 AvRV-1과 AvRV-2는 조류의 유전형인 NSP4[E]에 속하였다. 특히 turkey 유래 Ty-3가 가장 유전적으로 가장 근연관계에 있음을 알 수 있었다.

NSP4 유전자 발현

(1) 간접 형광항체법에 의한 recombinant virus의 확인
조류 로타바이러스에 특이적인 항혈청을 사용하여 간접형광항체법으로 확인한 결과 Fig. 2와 같이 recombinant virus가 감염된 세포에서만 강한 형광이 관찰되었다. 그러나 바이러스를 접종하지 않은 대조군(B)에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

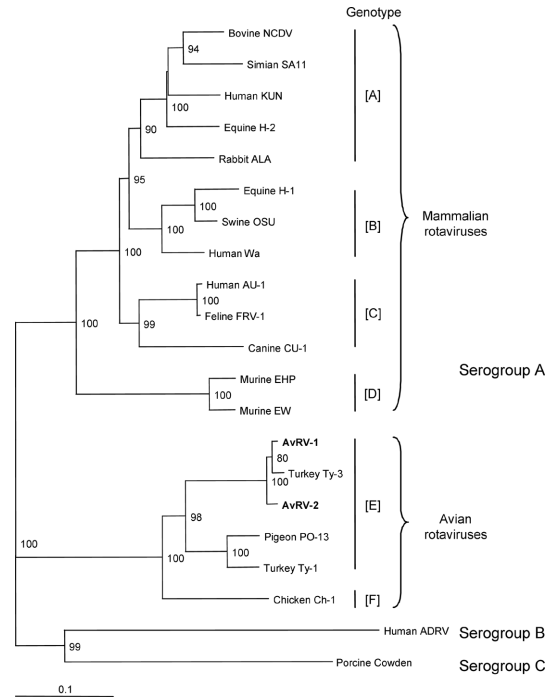


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on NSP4 nucleotide sequences of avian rotavirus AvRV-1 and AvRV-2 comparisons with representative strains of serogroup A, B and C rotavirus. The numbers at the nodes indicate the level of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 1,000 resampled datasets; only values above 50% are given. The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

(2) Western blot에 의한 NSP4 분석

Baculovirus expression system에 의해 발현된 NSP4의 성상을 SDS-PAGE와 Western blot으로 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. SDS-PAGE를 하여 Coomassie blue로 염색하여 본 결과 뚜렷한 NSP4 band를 확인할 수 없었다. 그러나 조류 로타바이러스에 특이한 항혈청을 사용하여 Western blot한 결과 뚜렷한 NSP4를 확인할 수 있었으며 NSP4가 glycosylation된 정도에 따라 크기를 달리하는 것을 관찰하였다. 즉, baculovirus가 감염된 Sf21 cell lysate에서 baculovirus에 의해 발현된 NSP4를 관찰할 수 있었으며 28, 26, 20 kDa의 NSP4 모두 뚜렷하게 관찰되었다.

(3) Tunicamycin의 효과

Recombinant baculovirus를 Sf21 cell에 접종하여 24, 48, 72시간동안 배양하여 수확한 cell lysate에서 모두 glycosylation 정도에 따른 28, 26, 20 kDa의 NSP4를 관

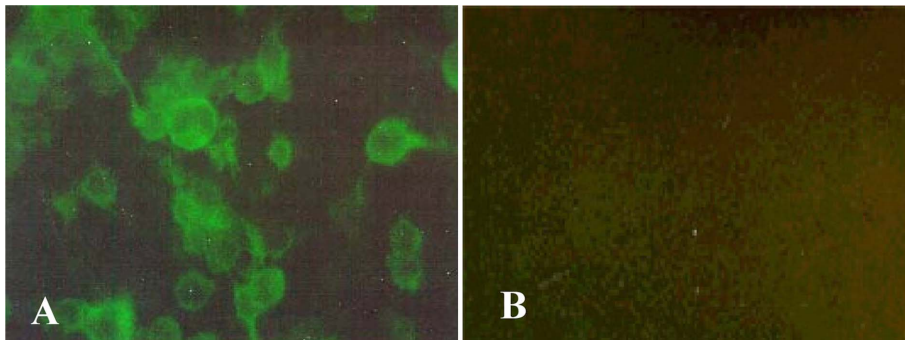


Fig. 2. Immunofluorescence of recombinant virus infected Sf21 cell ($\times 200$). Recombinant (A) and mock (B) infected Sf21 cells were reacted with AvRV-1 specific polyclonal antibody.

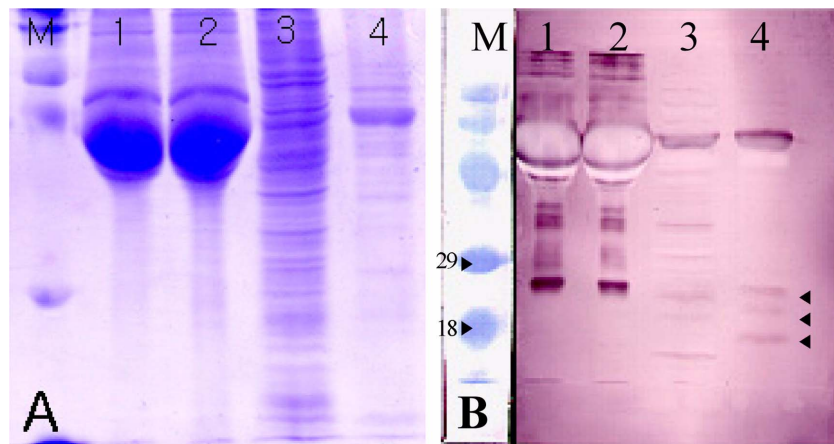


Fig. 3. Analysis of expressed NSP4 by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). Lane M: Molecular weight marker, lane 1: Mock-infected Sf21 cell supernatant, lane 2: NSP4 recombinant virus-infected cell supernatant, lane 3: Mock-infected Sf21 cell lysate, lane 4: NSP4 recombinant virus-infected cell lysate. NSP4 protein was indicated by arrows at lane 4.

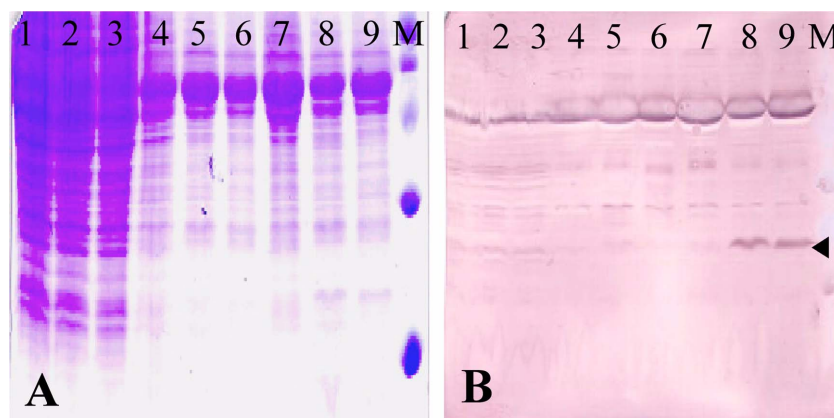


Fig. 4. Effects of tunicamycin on NSP4 glycosylation by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). Lane 1-3: Mock infected Sf21 cell lysate at 24, 48 and 72 hrs post infection, lane 4-6: NSP4 recombinant virus-infected Sf21 cell lysate in the absence of tunicamycin at 24, 48 and 72 hrs post infection, lane 7-9: NSP4 recombinant virus-infected Sf21 cell lysate in the presence of tunicamycin at 24, 48 and 72 hrs post infection.

찰할 수 있었다. 또한 N-linked glycosylation의 특이 억제물질인 tunicamycin을 처리한 결과 Fig. 4에서와 같이 nonglycosylation 20 kDa의 NSP4만이 관찰되었다.

고 찰

본 연구에서는 심한 설사증상을 보이는 칠면조 분변에서 분리한 조류 로타바이러스 AvRV-1와 AvRV-2를 대상으로 로타바이러스의 병원성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어진 NSP4의 염기서열을 분석하고, baculovirus expression system에서 발현하여 특성을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 염기서열분석 결과, AvRV-1와 AvRV-2의 NSP4유전자는 모두 727개의 핵산으로 구성되어 169개의 아미노산을 coding하는 1개의 open reading frame과 2개의 glycosylation 부위가 존재하는 것으로 확인되었다.

Zhang 등은 병원성이 강한 돼지 로타바이러스와 이를 약독화 시킨 바이러스의 NSP4 유전자를 비교 분석한 결과, 염기서열 432-461(131-140 aa)부위에서 두 바이러스 사이에 근거하여 이 부위가 병원성과 관련이 있다고 보고하였다 [27]. 또한 baculovirus expression system을 사용하여 병원성이 강한 돼지 로타바이러스의 NSP4를 발현시킨 후 순수 분리하여 장 상피세포에 투여한 결과 세포 내 칼슘 농도가 투여경로에 따라 6-10배 정도 상승하였으며 신생마우스에 투여 시 설사가 유발되는 개체 수가 약독화 NSP4 적용시보다 높은 수치를 보임으로 이 부위가 병원성과 관련이 있음을 보고하였다.

Serogroup A 로타바이러스는 NSP4 유전자 염기서열에 기초하여 5개(NSP4[A]~[E])의 유전자형으로 분류된다 [18, 20]. 사람 로타바이러스는 NSP4[A], [B] 및 [C]가 보고되어 있으나 NSP4[D]와 [E]는 조류와 마우스에서만 발견된다 [8].

Ito 등 [15]은 비둘기 유래 조류 로타바이러스인 PO-13의 NSP4 아미노산 염기서열이 포유류 로타바이러스 NSP4와는 32-35%의 낮은 상동성을 가짐을 보고하였다. 본 실험에서 칠면조의 설사 분변에서 분리된 AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4 유전자 염기서열은 외국 조류 로타바이러스인 칠면조 유래 Ty-1, Ty-3 및 비둘기 유래 PO-13과 모두 82.7% 이상의 높은 상동성을 보였다. 특히 AvRV-1과 AvRV-2는 칠면조 유래 Ty-3와 각각 97.7%, 98.3%의 가장 높은 상동성을 보여 유전적으로 가장 근연관계에 있음을 알 수 있었다. 그러나 Ito 등 [15]의 보고와 같이 사람, 원숭이, 소, 말, 개, 고양이, 토끼, 쥐 등 포유류의 NSP4 유전자와는 48.5-53.5%의 낮은 상동성을 보여, 포유류 로타바이러스의 NSP4 유전자가 장관독소로 작용하는 것처럼 본 실험에서 발현된 NSP4 유전

자도 장관독소로 작용하는 의문이다. 따라서 추후에 이러한 부분에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

본 실험에서는 NSP4의 특성을 규명하기 위한 실험으로 재조합 baculovirus에 의해 발현된 NSP4를 조류 로타바이러스 특이 항혈청을 사용한 간접 형광항체법과 Western blotting으로 확인할 수 있었다. 간접형광항체법 결과 NSP4 유전자가 삽입된 재조합 바이러스가 감염된 cell에서만 강한 형광이 관찰되었는데 이는 재조합 바이러스에 의해 발현된 NSP4가 AvRV-1 특이 항혈청과 반응하였기 때문이다. 그리고 Western blot 결과에서 재조합 바이러스가 감염된 Sf21 cell lysate에서 발현된 NSP4의 크기가 다른 것이 관찰되었는데 이는 glycosylation 정도에 따라서 이와 같은 성상을 띠기 때문으로 추정된다. 즉, NSP4에 존재하는 2개의 glycosylation site중 두 곳 모두에서 glycosylation이 일어나면 가장 크기가 큰 28 kDa, 한 곳에서만 glycosylation이 되면 26 kDa, 마지막으로 아무 곳에서도 glycosylation이 일어나지 않으면 20 kDa의 NSP4가 되는 것이라고 보고되어 있다 [22].

N-linked mannose glycosylation을 억제시키는 물질인 tunicamycin을 사용하여 NSP4의 glycosylation을 관찰한 결과 NSP4가 tunicamycin에 의해 glycosylation이 억제되어 glycosylation이 안된 20 kDa의 NSP4만이 관찰되었다. 따라서 NSP4가 glycoprotein임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 실험한 조류 로타바이러스의 NSP4 유전자에 대한 염기서열 분석과 NSP4의 특성은 조류 로타바이러스 NSP4 유전자를 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다. 그러나 조류 로타바이러스 NSP4 유전자가 장관독소로 작용하여 병원성과 관련되어 있는지에 대한 여부는 이 실험을 토대로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

로타바이러스에서 병원성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 NSP4 유전자를 조류 로타바이러스를 이용하여 RT-PCR로 증폭하고 크로닝한 후 염기서열을 분석 비교하였으며 baculovirus expression system을 이용하여 발현시킨 후 발현된 NSP4의 특성을 규명하였다.

칠면조에서 분리된 조류 로타바이러스(AvRV-1, AvRV-2)의 NSP4 유전자는 727개의 염기로 구성되어 있으며 base 41에서 시작하여 base 550을 끝으로 169개의 아미노산을 coding하는 1개의 open reading frame과 2개의 glycosylation 부위가 존재함을 확인하였다. AvRV-1과 AvRV-2의 NSP4 유전자의 염기서열은 서로 97.4%의 상동성을 보였으며, serogroup A 로타바이러스들의 NSP4

유전자 염기서열과 비교 분석한 결과, 상동성의 범위는 48.4%에서 98.3%로 포유류의 로타바이러스와는 낮은 일치성을 보였으나 조류에서 분리된 로타바이러스와는 높은 상동성을 나타냈다. Baculovirus expression system에 의해 발현된 NSP4를 간접형광항체법과 Western blotting 기법으로 확인하였으며 발현된 NSP4가 glycosylation된 정도에 따라 그 성상을 28, 26, 20 kDa 등으로 달리함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 강신영, Nagaraja KV, Newman JA. Group A 조류 로타바이러스의 병원성에 관한 연구. 대한수의학회지 1993, **33**, 217-225.
2. 백명순, 강신영, 김원용. 국내분리 소 로타바이러스 NSP4 유전자의 크로닝 및 염기 서열 분석. J Bacteriol Virol 2001, **31**, 55-61.
3. Ball JM, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. Science 1996, **272**, 101-104.
4. Bergeland ME, McAdaragh JP, Stotz I. Rotaviral enteritis in turkey poults. In: Proceedings of the 26th West Poultry Disease Conference. p.129-130, 1977.
5. Bridger JC. Novel rotaviruses in animals and man. Ciba Found Symp 1987, **128**, 5-23.
6. Burke BM, McCrae A, 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 1994, **75**, 2205-2212.
7. Chowdhury K. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1991, **19**, 2792.
8. Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. Arch Virol 2000, **145**, 371-383.
9. Davitt CM, Reynolds DL. Characterization of a group D rotavirus. Avian Dis 1993, **37**, 749-755.
10. Dong YJ, Zeng CQY, Ball JM, Estes MK, Morris AP. 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 1997, **94**, 3960-3965.
11. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev 1989, **53**, 410-449.
12. Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. Curr Top Microbiol Immunol 1983, **105**, 123-184.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985, **39**, 783-791.
14. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
15. Ito H, Sugiyama M, Masubuchi K, Mori Y, Minamoto N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. Virus Res 2001, **75**, 123-138.
16. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed.). Mammalian protein metabolism, Vol. 3. pp. 21-132, Academic Press Inc, New York, 1969.
17. Kang SY, Saif LJ. Production and characterization of monoclonal antibodies against an avian group A rotavirus. Avian Dis 1991, **35**, 563-571.
18. Lin SL, Tian P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. Virus Genes 2003, **26**, 271-282.
19. McNulty MS, Todd D, Allan GM, McFerran JB, Greene JA. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chicken: recognition of four serogroups. Arch Virol 1984, **81**, 113-121.
20. Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from group A avian rotaviruses. Virus Res 2002, **89**, 145-151.
21. Pedley S, Bridger JC, Chasey D, McCrae MA. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. J Gen Virol 1986, **67**, 131-137.
22. Petrie BI, Estes MK, Graham DY. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. J Virol 1983, **46**, 270-274.
23. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987, **4**, 406-425.
24. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X Windows Interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. Nucleic Acid Res 1997, **24**, 4876-4882.
25. Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQY, Schilling WP. The rotaviral nonstructural glycoprotein

- NSP4 mobilizes Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1995, **69**, 5763-5772.
26. **Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK.** The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol* 1994, **68**, 251-257.
27. **Zhang M, Zeng CQY, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK.** Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 1998, **72**, 3666-3672.
28. **Zhang M, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK.** Functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 2000, **74**, 11663-11670.