

국내 돼지에 존재하는 내인성 레트로 바이러스의 엔벨로프 유전자 클로닝 및 분자 계통학적 분석

이동희* . 유재영* . 이정은* . 김계웅**** . 박홍양* . 이훈택*** . 김영봉***
건국대학교 축산대학 동물생명공학전공*, 건국대학교 의생명과학 연구원**,
성균관대학교 생명공학부 유전공학과***, 공주대학교 산업과학대학 동물자원학과****

Molecular Cloning and Phylogenetic Analysis of PERVs from Domestic Pigs in Korea (*env* gene sequences)

Donghee Lee***, Jae-Young Yoo*, Jungeun Lee*, Gye-Woong Kim****, Hong-Yang Park*,
Hoon-Taek Lee*** and Young-Bong Kim**

Department of Biotechnology, College of Animal Husbandry, Konkuk University*,
Institute of Biomedical Science and Technology, Konkuk University**,
Department of Genetic Engineering, Faculty of Lifescience and technology, Sungkyunkwan University***,
Department of Animal resource science, College of Industrial Science, Kongju National University****

ABSTRACT

Xenotransplantation may help to overcome the critical shortage of human tissues and organs for human transplantation. Swine represents an ideal source of such organs owing to their anatomical and physiological similarities to human besides their plentiful supply. However, the use of organs across the species barrier may be associated with the risk of transmission of pathogens, specially porcine endogenous retroviruses (PERVs). Although most of these potential pathogens could be eliminated by pathogen-free breeding, PERVs are not eliminated by this treatment. PERVs are integrated into the genome of all pigs and produced by normal pig cells and infect human cells. They belong to gamma retroviruses and are of three classes viruses: A, B and C. In the present study, PCR based cloning was performed with chromosomal DNA extracted from pigs from domestic pigs in Korea. Amplified PCR fragments of about 1.5 Kb, covering the partial *env* gene, were cloned into pCR2.1-TOPO vectors and sequenced. A total of 91 *env* clones were obtained from domestic pigs, Berkshire, Duroc, Landrace and Yorkshire in Korea. Phylogenetic analysis of these genes revealed the presence of only PERV class A and B in the proportion of 58 % and 42 %, respectively. Among these, 28 clones had the correct open reading frame: 18 clones in class A and 10 clones in class B. Since both these PERV classes are polytropic and have the capacity to infect human cells, our data suggest that proviral PERVs have the potential to generate infectious viruses during or after xenotransplantation in human.

(Key words : PERV, Xenotransplantation, Envelope, Pig, Korea)

I. 서 론

장기 이식 기술의 발달에 의하여 이식이 필
요한 환자의 증가에 비해 필요한 인간 장기의

절대적 부족현상으로 인하여 돼지의 장기나 조
직 또는 세포를 인간에게 이식하는 이종간 장
기 이식이 많은 관심 하에 활발히 연구가 진행
되고 있다(Dorling 등, 2002; White와 Nicholson,

Corresponding author : Kim, Young Bong, Department of Biotechnology, College of Animal Husbandry, Konkuk University 143-701, Tel : 02-450-4208, Fax : 02-455-1044, E-mail : Kimera@konkuk.ac.kr

1999). 최근 조류 인플루엔자, SARS, AIDS 등 동물유래의 바이러스 전염병이 문제화 되면서, 돼지를 이용한 인간으로의 장기 이식 또한 이러한 문제점이 크게 부각 되었다(Magre 등, 2003). 비록 무균돼지의 사육을 통하여 대부분의 외인성 병원균은 제거가 가능하지만, 돼지 유래의 내인성 병원균은 제거가 거의 불가능하다(Swindle, 1998).

Porcine endogenous retroviruses (PERVs)는 가장 대표적인 돼지의 내인성 바이러스의 하나로서, 1970년에 처음으로 보고 되었다(Breese, 1970). *Retroviridae*과 *Gammaretrovirus* 속으로 분류 되어졌으며(Klymiuk 등, 2002), 염기서열 및 아미노산 서열, 형태학적으로 백혈병이나 면역 결핍증을 일으키는 murine leukemia virus와 feline leukemia virus와 같이 γ -레트로바이러스에 속하는 것으로 보고 되었다(Tacke 등, 2000). PERVs는 돼지 내에서는 어떠한 병리적 증상을 나타내지 않으며, 돼지 genome 안에 약 13종의 PERVs가 존재하는 것으로 보고 되었으며 대부분 provirus는 유전자 결실 또는 돌연변이로 인해 실제 바이러스를 만들 수 없는 형태로 존재하고 있다(Patience 등, 1997). 이들 중 γ 1 family내 subfamily A, B, C세 class가 바이러스를 만들고 감염능이 있는 것으로 알려져 있다(Magre 등, 2003). 많은 인간 세포는 PERV-A와 PERV-B에 특이적인 수용체를 가지고 있으며 PERV-C에 특이적인 수용체는 HT1080 세포주를 제외하고 아직까지 보고 된 바 없다(Mollnes 등, 1999; Patience 등, 1997). 가장 최근에 발생한 것으로 보이는 PERV-C는 PERV-A와 재조합 반응을 일으키면서 그 감염성이 500배나 증가하는 것으로 밝혀져 주목을 받았다(Harrison 등, 2004). 감염성 PERVs는 *in vitro* 상에서는 넓은 범위의 감염성을 보이지만 *in vivo* 상에서는 면역능력을 결핍시킨 쥐 외에 아직까지 알려진 예는 없다(Heneine 등, 1998; Patience 등, 1998). 그러나 실제 장기 이식을 받는 환자는 지속적으로 면역 억제제를 투여하기 때문에 PERV에 대한 위험성을 더욱 부각시킨 결과라 할 수 있겠다. 또한 사람의 유전자 안에도 PERVs와 유사한 human endogenous retroviruses (HERVs)가 존

재하고 있으며, 이는 분류상 PERV와 비슷한 γ retroviruses에 속한다. 현재까지 밝혀진 HERVs 중 실제 감염성이 있는 바이러스는 알려져 있지 않으나 이종간 장기 이식에 의해 PERVs가 HERVs와 재조합을 일으켜 새로운 형태의 바이러스 생성은 무시될 수 없으며, 에이즈를 일으키는 Human Immunodeficiency Virus (HIV)와 같이 인류에 재앙을 가져올 수 있는 위험성을 내포하고 있다(Klymiuk 등, 2002, 2003).

본 연구는 기존에 보고하였던 *pol* 유전자에 의한 국내 돼지의 PERVs의 분포에 이어(김 등, 2004), *env* 유전자를 이용하여 PERV에 대한 기초 자료를 제시하고자 한다. 국내의 대표적인 네 종류의 돼지를 선정하여 각 종동별 5마리의 돼지 모근으로부터 추출한 genomic DNA를 사용, 유전자 증폭을 통해 *env* 유전자를 클로닝하여, PERVs의 염기서열 및 추론된 아미노산 서열의 분석 및 분포를 비교해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료 및 Genomic DNA(gDNA) 추출

본 연구에 사용된 공시재료는 경기도 K 종돈 농장에서 사육되고 있는 Yorkshire종 5두와 Landrace종 5두 그리고, 충남 C 종돈장에서 사육하고 있는 Duroc종 5두 그리고 Berkshire종 5두 총 20 두를 공시동물로 선정하였다. 선정된 공시동물에서 모발을 채취하여 4 °C icebox에 넣어 실험실로 운송 한 후 QIAamp Mini Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 gDNA를 추출, pooling하여 실험에 이용하였으며, PCR 실험 시까지 -25 °C에 보관하였다.

2. PERV proviral DNA 증폭

모든 class의 *env* 유전자를 클로닝하기 위하여 기존에 보고 된 Genbank의 모든 PERV *env* sequence들 (AF038600, AF130444, AF296168, AF402660, AF426916-46, AF435966-7, AF507940, AJ288584-92, AY099323-4, AY124035-52, AY288779, AY312517-33, Y12238-9; PERV-A/B/C 포함)을

수집하였다. 수집된 데이터를 기준으로 *env* 유전자의 표면 당 단백질의 개시 코돈 앞과 p15E의 상동성이 높은 지역을 이용하여 sense 5'-ACCTGGATCCATGCATCCCACGTTAA-3', antisense 5'-(A/G)TCTGAAGTGGTTCTACAGAAC (A/C) G(A/G) A-3'으로 degenerate primer를 작성하였다. 제작된 primers는 약 1.5 kb 정도의 증폭산물을 기대할 수 있다. PCR 반응에는 50 ng genomic DNA를 사용하였으며, PCR 반응에 사용된 reaction mixture는 반응 buffer내 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, primer는 각각 10 pM, 2 unit *Taq* (Super-Bio, Korea)을 사용하였다. PCR 조건은 GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 94 °C 3분으로 hot start를 1 cycle 수행 한 후, 94 °C에서 30초간 denaturation 반응을 시킨 후, 55 °C에서 30초간 annealing 반응, 그리고 72 °C에서 1분간 extension 반응을 30 cycle을 실시하고, 72 °C에서 7분간 반응시켜 확실히 반응을 종결 시켰다. 증폭된 산물은 0.8 % 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하여 확인하였다

3. 클로닝

증폭된 약 1.5 kb의 PCR 산물은 gel extraction kit(Qiagen, USA)를 이용하여 아가로스 겔로부터 분리 정제 하였으며, 정제된 PCR 산물은 pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, USA)에 ligation 반응을 수행하여 *E. coli* Top10F'에 형질전환을 수행하여 클로닝하였다.

4. *env* 염기서열 분석

클로닝된 PERV *env* 유전자는 M13 forward와 M13 reverse sequencing primer, 증폭에 사용된 primer sets를 이용 ABI sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 확인하였다. 염기서열 결과를 이용하여 약 1.5 kb의 염기서열을 contig하였으며, Genbank에 등록되어 있는 PERVs *env*를 reference strain (AF038600, AF356698, AF507940, AF507940, AJ288587, AJ288589, AY312521, Y12238, Y12239) 으로 ClustalX ver. 1.81을 이용하여 alignment를 실시하였다.

5. Phylogenetic analysis

Clone들의 계통분석학적 관계를 비교해 보기 위하여, 염기서열 분석이 완료된 91개 전체 clone의 염기서열을 컴퓨터 프로그램(Treecon ver. 1.3b)을 사용하여 계통 분석도를 작성하였다(Van de Peer와 De Wachter 1994). 계통 분석도는 neighbor-joining, Galtier와 Gouy, 그리고 Maximum parsimony 방법을 이용하여 계통수를 작성하였다. 계통수의 topology는 100회 resampling하여 bootstrap 값을 구하였다

III. 결과 및 고찰

1. PERV *env* 유전자 클로닝 및 분포 조사

돼지로부터 분리한 genome상에 존재하는 PERV *env* 유전자를 클로닝하기 위해 class A, B, C에 공통적인 primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 반응을 통하여 PERV *env* 유전자의 개시 코돈을 포함하여 transmembrane domain (p15E)의 일부를 포함하는 약 1.5 kb의 산물을 얻을 수 있었다. 얻어진 산물을 이용하여 pCR2.1-TOPO vector에 클로닝하여 Berkshire 17개, Duroc 22개, Landrace 21개, Yorkshire 31개로 총 91개의 clone들을 확보하였다. 확보된 clone은 M13 forward, M13 reverse sequencing primer와 클로닝에 사용한 primer를 이용하여 4회 이상 염기서열 분석을 수행하여 산물의 염기서열을 결정하였다. Genbank에 등록된 바이러스 주를 기준으로 염기서열을 alignment 한 결과 계통 분석학적 계통도를 그리기 전에 크게 class A와 B로 나뉘어 짐을 알 수 있었다. Berkshire로부터 분리된 clone 17개 중 11개는 class A에 6개는 class B에 속하였으며, Duroc로부터 분리된 clone 22개 중 10개가 class A, 11개가 class B로, Landrace로부터의 clone 21개 중 13개가 class A에 8개가 class B, Yorkshire의 31개 clone 중 18개가 class A, 13개가 class B로 분류 되었다. Class 간의 분포를 보면 class A가 57%, class B가 43%로 두 class 사이의 분포는 큰 차이를 보이지 않았으며, 개체내의 분포도 Berkshire

Table 1. PERV *env* partial clones from domestic pigs from Korea

Strain	Berkshire		Duroc		Landrace		Yorkshire	
	PERV-A	PERV-B	PERV-A	PERV-B	PERV-A	PERV-B	PERV-A	PERV-B
# of Clones	11(4) ^a	6(2)	10(3)	11(4)	13(5)	8(2)	18(6)	13(2)

^a() : number of clones have correct open reading frame.

class A와 class B는 각각 64%와 36%, Duroc 45%와 55%, Landrace 61%와 39%, Yorkshire 58%와 42%의 분포를 보였다(Table 1).

PERVs는 종에 따라 10에서 50개 proviral 유전자가 돼지 genome에 존재하며, *env* 유전자의 염기서열 특히 glycoprotein의 variable region A (VRA)의 차이에 의해 최소한 3종류의 class (A, B와 C)의 PERVs가 감염성 바이러스로 존재하는 것으로 알려져 있다(Akiyoshi 등, 1998). Genome 상에 존재하는 PERV provirus는 결실, 삽입, 혹은 점 돌연변이 등에 의하여 많은 경우가 올바른 virus particle을 생성하지 못한다. Steffi 등에 의하면 Large White SPF pig herd의 BAC library에서 PERV envelope sequence 중 최소 25% 정도만이 올바른 open reading frame(ORF)을 가지고 있다고 보고되어 있다(Steffi 등 2000). 본 실험결과로는 clone 중 Berkshire에서 class A 4개와 class B 2개, Duroc에서 class A와 B 각각 3개와 4개, Landrace 5개와 2개, Yorkshire 6개와 2개는 올바른 ORF를 갖는 바이러스가 생산될 수 있는 clone임을 확인하였다. 이는 전체 조사된 clone 중에 30% 라는 상당히 높은 수치로서 기존에 보고된 25% 보다 다소 높은 수치이지만, 본 연구에 사용된 sequence가 *env* full sequence가 아닌 partial임을 감안할 때 유사한 결과라고 추정된다. 이 결과를 통하여, 이종간 장기 이식 시 바이러스가 생성될 수 있어 장기 이식 시 절대 간과해서는 안 될 중요한 인수 공통 감염 요인임을 알 수 있었다.

Primer의 제작에 있어 class A, B, C에 모두에 대한 공통 primers를 이용하여 proviral DNA를 증폭하였지만 class C는 나오지 않았다. Class C는 nonhumantropic으로 조직과 세포의 종류에 따라 발현량이 다르며, 그 발현량 역시 현저히 낮은 것으로 보고되어 있다(Stefan 등, 2003; Steffi

등, 2000). 하지만 최근 연구에 의해서 class A와 C의 recombinant가 human cell infectivity에 큰 영향을 미친다는 보고와 함께 중요한 class로 부각되고 있다(Wood 등, 2004). 본 실험의 공시재료로 사용된 돼지의 증폭된 산물에서 class C가 발견되지 않은 이유는 PERV- A/B class specific primer와 PERV-C specific primer를 이용하여 PCR을 수행하여 본 결과, primer의 부적 절성이라기 보다는 clone들의 N값이 작아서 class C가 나오지 않은 것이라 생각되며 더 많은 clone의 분석이 요구된다.

2. PERV *env* 유전자 염기서열 분석 및 아미노산 서열 분석

분석된 염기 서열을 토대로 아미노산 염기서열을 분석한 결과, 대부분의 clone들이 결실, 삽입, 점 돌연변이 등에 의해 올바른 바이러스를 생성하지 못하는 non-functional clone들이었으나, clone 중 class A로 분류된 18개 clone과 class B로 분류된 10개, 총 28개의 clone은 올바른 ORF를 가지고 있었다. Table 2는 ORF이 맞는 clone과 대표적인 reference 주간 intra/inter-class 간 유전자와 아미노산 서열 간 상동성을 비교를 한 것이다. 돼지 개체 간 차이를 제외한 class내의 염기 서열 상동성은 95.9%에서 99.9%로 높은 상동성을 확인 할 수 있었으며, Class A와 B에서는 64.3%에서 66.6%로 많은 차이를 지님을 알 수 있었으며, 아미노산 서열 간의 상동성도 염기 서열 상동성과 비슷한 차이를 확인 할 수 있었다.

PERV *env* 유전자는 발현되면 세포막으로 이동되어 바이러스의 코어 부분을 세포막과 함께 둘러싸므로써 바이러스를 생성하게 된다. 이 envelope 단백질은 transmembrane domain 내에

A

	1											120
Y12238	MHPTLSRRHL	PIRGGKPKRL	KIPLSFASIA	WFLTLSITPQ	VNGKRLVDSP	NSHKPLSLTW	LLTDSGTGIN	INSTQGEAPL	GTWPELYYC	LRSVIFGLND	QATPPDVLRA	YGFYVCPGPP
AY288779	R											
B3												
B11												
B15			C									
B23												
D8												
D12	P	E-K			A	F	S-T					N
D15		E-K			A	F	S-T					N
L9	H								K			
L15			S									
L20												
L30	Q				C-L				II			
L34												
Y9												
Y10	S			P								
Y12					C-L				II			
Y24		E-K			A-L	F	S-T					LS
Y30	R	S-RKT	EN-KLRLLR	VH	SI							N
Y33												
Y12238	NNEEYCGNPQ	DFFCQWVSCV	TSVDGANWKP	VSQQDRVSYQ	FVANNPTSXQ	FVYGHGRWKD	WQQRVQKQVR	NKQISCHSLD	LDYLKISFTE	KGGQFNIQKW	VNGISWGIYV	YGGSGRRKGS
AY288779		V									M	
B3												
B11												
B15												
B23												
D8												
D12				S				N			M	T-R
D15				S				N			M	T-R
L9							G					
L15												
L20												
L30												
L34												
Y9												
Y10				A								
Y12												
Y24					S			G	N			M
Y30												T-R
Y33												
Y12238	VLTIRLRIET	QMEPPVYAGP	NKGLABQGGP	IQQQRPSNP	SDYNTTSGSV	PTEPNITIKT	GAKLFSLIQG	APQALNSTTP	EATSSCWLCI	ASGPPYYEGM	ARGGKFNVTX	EHRDQCTWGS
AY288779							N					
B3												
B11												
B15		K										
B23		K										
D8												
D12					V	L	P	F				
D15					V	L	P	F				
L9												
L15												
L20												
L30												
L34												
Y9												
Y10												
Y12												
Y24												
Y30												
Y33												
Y12238	VQLTLTEVS	GKGTICIGMP	FSHQILCNIT	EAFNRTSESQ	YLVPGYDRWW	ACNTGLTPCV	STLVFNQTKD	FCVMQIVPR	VYYYPEKAVL	DEYDVRVVRP	KREPISLTLA	VMLGLGVAAG
AY288779												
B3												
B11		R										
B15												
B23												
D8				S								
D12												
D15												
L9												
L15												
L20												
L30												
L34												
Y9												
Y10												
Y12												
Y24												
Y30												
Y33												
Y12238	VGTGTAALIT	GPQLEKGLS	NLHRIVTIDL	QALEKSVSNL	EESLTSLSEV	VLQNR						
AY288779												
B3												
B11												
B15												
B23												
D8												
D12	E											
D15	E											
L9												
L15												
L20												
L30												
L34												
Y9												
Y10												
Y12												
Y24												
Y30												
Y33												

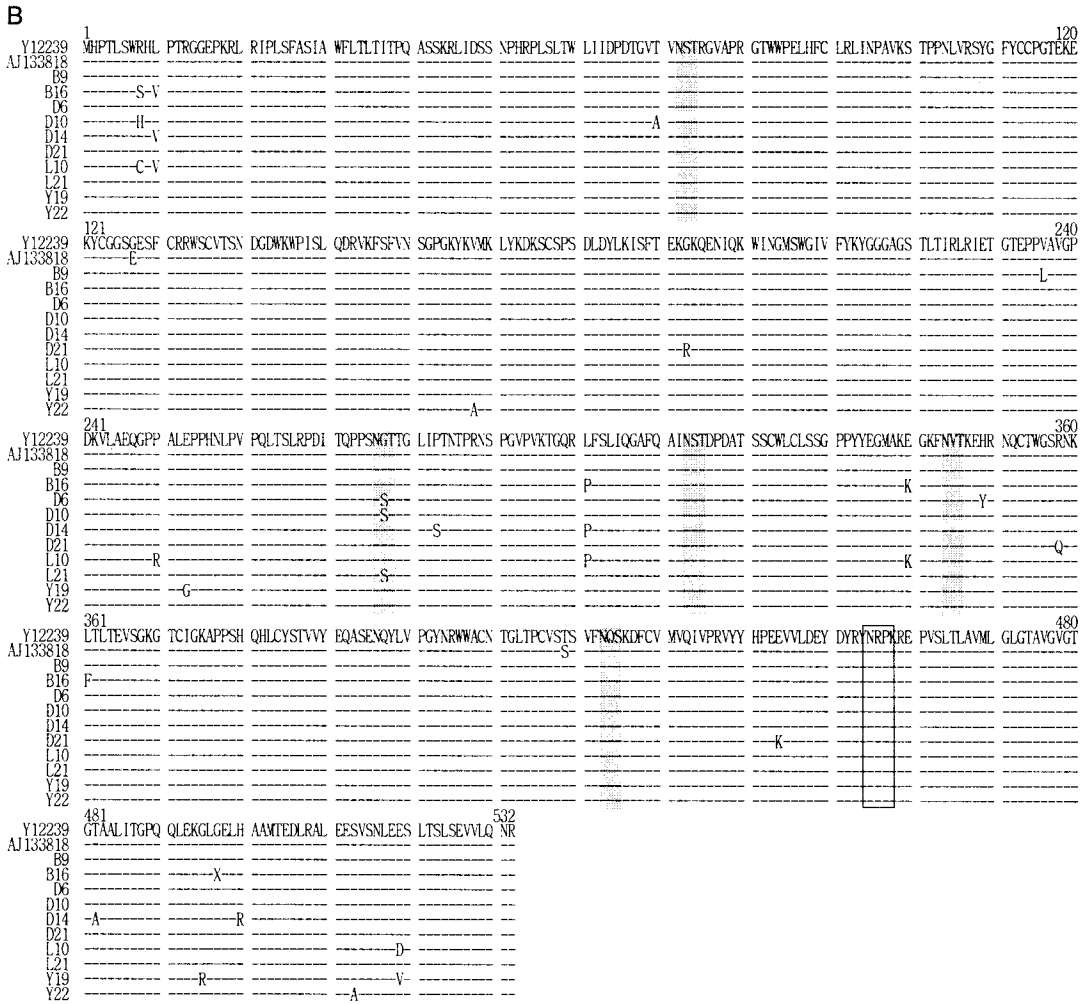


Fig. 1. Alignment of deduced amino acids of PERV-A and B *env* from domestic pigs from Korea. Deduced amino acids sequence of cloned *env* region of the gp70 (envelope surface glycoprotein) and partial p15E were aligned. The panel A is alignment with PERV A (Y12238 and AY288779 used as a reference strain) and the panel B is alignment with PERV B (Y12239 and AJ133818 used as a reference strain). B clones were originated from Berkshire, D clones from Duroc, L clones from Landrace, and Y clones from Yorkshire respectively. Characters in shadow box indicate potential glycosylation sites of envelope surface glycoprotein. Characters in the box of solid line indicate cleavage site separating peptides gp70 and p15E. Dashes indicate identical amino acid.

cleavage site (Arg/Lys-X-Lys-Arg)가 존재하여 크게 숙주 세포의 수용체에 결합하게 되는 표면 당 단백질로 HIV-1의 경우 gp120에 해당하는 gp70 부분과 인지질 이중막 사이에 묻혀있게 되는 transmembrane domain (p15E)으로 나뉘게 된다. gp70은 10개의 잠재적 glycosylation site를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 감염성에 큰

영향을 주는 것으로 보고되어 있다(Kenji 등, 2003; Oldmixon 등, 2002). <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html> 웹 사이트의 단백질 구조 예측 서비스를 통하여 PERV의 envelope 단백질은 당단백질로 class A에서 모두 10개의 잠재적인 glycosylation site (Asn-X-Thr/Ser)를 발견할 수 있었으며, class B에서는 5개의

glycosylation site를 확인 할 수 있었다(Fig. 1). gp70과 p15E로 분리하는 cleavage site는 Arg/Lys-X-Lys-Arg으로(Cianciolo 등, 1984), 459에서 462까지의 아미노산 서열에 위치하고 있었으며, 아미노산 서열 465에서 490까지의 부분이 transmembrane domain으로 helical structure를 가지고 소수성 아미노산인 Leu, Ala, Val이 많이 분포하며, class A와 B 모두 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 특이할 만한 사항으로서는 분석한 clone들 중 Landrace로부터 얻은 L9 clone은 cleavage site의 아미노산 잔기가 Arg/Lys-X-Lys-Arg에서, arginine/lysine 잔기 대신에 tryptophan으로 대체되어 있음을 알 수 있었다. 이 clone은 올바른 cleavage가 일어나지 못하여 올바른 엔벨로프의 기능을 수행하지 못하리라 추측되며 발현 후 western blot 분석을 통해 알아보아야 할 것으로 사료된다. Glycosylation site Asn-X-Thr/Ser에서, L12, L15, Y24 clone의 164번째 잔기는 Asn이 Ser으로 바뀌어 있고, L9 clone의 318번째 잔기는 Thr/Ser 대신 Lys으로 바뀌

어 있으며, Duroc으로부터 얻은 D8 clone 역시 388번째 아미노산 잔기가 Asn 잔기 대신에 Ser으로 바뀌어져 있어서 N-glycosylation이 되지 않을 것으로 예측된다. N-glycosylation이 만약 올바르게 이루어지지 않으면 감염능 등의 이상 등 변화가 예상되며 앞으로 N-glycosylation site의 mutation study 등을 통해서 정확한 관계를 연구해 봐야 할 것이라 생각된다.

3. PERV env 유전자 염기서열을 이용한 계통 분석

염기서열 분석이 된 총 91개 clone의 염기서열과 Genbank에 등록된 PERV-A (AY312521, AF507940, Y12238), PERV-B (AJ288587, AJ288589, Y12239), PERV-C (AF038600, AF402662) 그리고 outgroup으로 PERV-E (AF356698)를 reference strain으로 사용하여 Neighbor-Joining 방법을 이용하여 계통 분석학적 관계를 알아보았다. PERV-E는 유전학적으로 사람에 존재하는

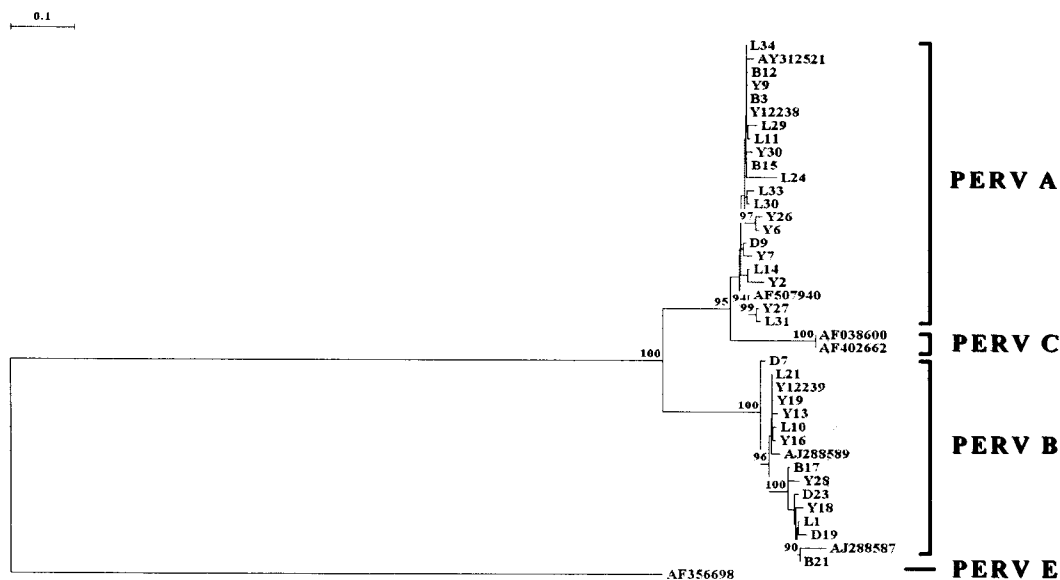


Fig. 2. Neighbor-joining tree based on 1.5 kb nucleotides sequences of PERV env obtained from domestic pigs from Korea.

The tree was generated by the methods of Galtier & Gouy(1995) on the basis of env-sequences using the Treecon ver 1.3b. Numbers at nodes indicate bootstrap value of 100 resampled datasets. PERV-A (AY312521, AF507940 and Y12238), PERV-B (AJ288587, AJ288589 and Y12239), PERV-C (AF038600 and AF402662) and PERV-E (AF356698) were used as a reference strain.

human endogenous retroviruses와 유사하며 양적으로 PERV-A, B, C 와 비슷하게 존재하나 유전적 거리가 멀어 이를 outgroup으로 선정 하였다. Fig. 2는 전체 91개 바이러스 주를 포함한 tree를 만든 후 유사한 것을 제외하여 나타낸 것이다. Class B는 100%의 bootstrap 값으로 clade를 이루는 반면 class A 와 C는 95%의 값으로 같은 clade를 이루며 class C만이 100%로 나뉘어 졌다. Class C는 지금까지 2주 (AF038600, AF402662)를 포함하여 소수만이 Genbank에 등록되어 있기에 제한적으로 분석 될 수 밖에 없었다. Class A와 B 의 염기서열이 약 35% 이상 다르기 때문에(Table 2) 실제 계통분석 전에 이 두 subgroup간 바이러스 주 구분을 할 수 있었으며 계통분석을 통한 subgroup 분석은 Table 1의 결과와 동일하게 나왔으며 C형은 나오지 않았다.

본 연구는 국내 주요 축종인 네 종류의 종돈으로부터 분리된 총 91개의 PERV envelope 유전자 clone들의 분석을 통해, 각 class 내의 높은 상동성을 확인 할 수 있었으며, 그 중 30%에 해당되는 clone들이 올바른 PERV 당 단백질을 생산할 수 있는 clone들로 확인되어 이종간 장기 이식시 감염의 위험성을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 본 연구를 통하여 얻어진 envelope의 표면 당 단백질 부분은 PERVs의 class 및 숙주의 범위와 특이성을 결정할 뿐만 아니라 중화항체(neutralizing antibody) 생성에 필수적인 항원의 역할을 하기 때문에 큰 의미를 가진다. 특히 인간 세포에 감염될 수 있는 class가 크게 A, B 두 class임을 감안하였을 때, 본 연구에서 클로닝된 엔벨로프 유전자들은 중화 항체 생산을 통한 PERV 제어에 적용해 볼 수 있으리라 사료된다.

IV. 요약

돼지를 이용한 이종간 장기 이식은 장기 공급 부족 문제를 해결해 줄 수 있는 가능성을 제공해 주는 차세대 사업의 하나이다. 그러나 돼지 장기를 이용한 이종간 장기 이식은 현실적으로 면역학적 문제 외에도 가축 유래 전염

성 병원균에 대한 안정성 문제가 심각하게 고려되고 있다. 유전자 적중 및 도입, 형질전환 돼지 생산 기술은 면역학적 문제를 해결할 수 있는 가능성을 제공해 주는 반면 외인성 병원균에만 국한된 무균 사육환경을 통한 무균돼지 생산은 아직 파악되지 못한 수 많은 내인성 바이러스 존재로 한계성을 보였으며 이종간 장기 이식 연구에서 해결해야 할 커다란 숙제로 남아있다.

본 연구는 기존에 보고한 *pol* 유전자를 이용한 국내 돼지에 존재하는 내인성 레트로 바이러스의 분포에 이어(김 등, 2004), 국내 돼지(Landrace, Berkshire, Yorkshire, Duroc)의 genome 내 PERVs *env* 유전자 염기 서열을 비교하여 PERV 제어에 대한 기초 자료로 제공하고자 한다.

총 91개의 clone들의 분석을 통해, 각 class 내의 높은 상동성을 확인 할 수 있었으며, 그 중 30%에 해당되는 clone들이 올바른 PERV envelope를 만들 수 있는 clone들로 확인되어 이종간 장기 이식시 감염의 위험성을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 본 연구를 통하여 얻어진 envelope의 표면 당 단백질 부분은 PERVs의 class 및 숙주의 범위와 특이성을 결정할 뿐만 아니라 중화항체(neutralizing antibody) 생성에 필수적인 항원의 역할을 하기 때문에 큰 의미를 가진다. 특히 인간 세포에 감염될 수 있는 class가 크게 A, B 두 class임을 감안하였을 때, 본 연구에서 클로닝된 엔벨로프 유전자들은 중화 항체 생산을 통한 PERV 제어에 적용해 볼 수 있으리라 사료된다.

V. 사 사

본 연구는 2004년도 건국대학교 학술진흥연구비에 의해서 수행되었습니다.

VI. 인용 문헌

1. Akiyoshi, D. E., Denaro, M., Zhu H., Greenstein, J. L., Banerjee, P. and Fishman, J. A. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol.* 72(5):

- 4503-4507.
2. Breese, S. S. Jr. 1970. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:401-404.
 3. Cianciolo, G. J., Kipnis, R. J. and Synderman, R. 1984. Similarity between p15E of murine and feline leukemia viruses and p21 of HTLV. *Nature* 311:1515.
 4. Dorling, A. 2002. Clinical xenotransplantation; pigs might fly? *Am J Transplant*. 2:695-700.
 5. Harrison, I., Takeuchi, Y., Bartosch, B. and Stoye, J. P. 2004. Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J Virol*. 78(24):13871-13879.
 6. Heneine, W., Tibell, A., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Rosales, G. V., Mathews, A., Korsgren, O., Chapman, L. E., Folks, T. M. and Groth, C. G. 1998. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet*. 29;352(9129):695-699.
 7. Kenji, H., Shuji, M., Takayuki, M., Junko, Y., Keizo, T., Mitsunori, O., Hikaru, M. and Ryota, S. 2003. The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity. *Biochemical Biophysical Research Communications* 310:327-333.
 8. Klymiuk, N., Muller, M., Brem, G. and Aigner, B. 2002. Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences. *J Virol* 76: 11738-11743.
 9. Klymiuk, N., Muller, M., Berm, G. and Aigner, B. 2003. Recombination analysis of human-tropic porcine endogenous retroviruses. *J. Gen. Virol.* 84:2729-2734
 10. Magre, S., Takeuchi, Y. and Bartosch, B. 2003. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol*. 13:311-329.
 11. Mollnes, T. E. and Fiene, A. E. 1999. Xenotransplantation : how to overcome the complement obstacle? *Mol Immunol*. 36:269-769.
 12. Oldmixon, B. A., Wood, J. C., Ericsson, T. A., Wilson, C. A., White-Scharf, M. E., Andersson, G., Greenstein, J. L., Schuurman, H. J. and Patience, C. 2002. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol*. 76(6):3045-30482.
 13. Patience, C., Takeuchi, Y. and Weiss, R. A. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*. 3:282-286.
 14. Patience, C., Patton, G. S., Takeuchi, Y., Weiss, R. A., McClure, M. O., Rydberg, L. and Breimer, M. E. 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet*. 29;352(9129); 699-701.
 15. Stefan, J. T., Volker, S. and Joachim, D. 2003. Differences in Release and Determination of Subtype of Porcine Endogenous Retroviruses Produced by stimulated Normal Pig Blood Cells. *Intervirolog* 46:17-24.
 16. Steffi, B., Claire, A. and Andre, J. 2000. Study of Full-Length Porcine Endogenous Retrovirus Genomes with Envelope Gene Polymorphism in a Specific-Pathogen-Free Large White Swine Herd. *J. Virol* 74(18):8575-8581.
 17. Swindle, M. M. 1998. Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862:111-120.
 18. Tacke, S. J., Kurth, R. and Denner, J. 2000. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation. *Virol*. 268: 87-93.
 19. Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R. A., Banerjee, P. T., Le Tissier, P. and Stoye, J. P. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72: 9986-9991.
 20. Van de Peer, Y. and De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10:569-570.
 21. Weiss, R. A. 1998. Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* 391:327-328.
 22. Wilson, C. A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C. E., Rose, T. M. and Burd, P. 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72: 3082-3087.
 23. White, S. A. and Nicholson, M. L. 1999. Xenotransplantation. *Br. J. Surg.* 86:1499-1514.
 24. Wood, J. C., Quinn, G., Suling, K. M., Oldmixon, B. A., Van Tine, B. A., Cina, R., Arn, S., Huang, C. A., Scobie, L., Onions, D. E., Sachs, D. H., Schuurman, H. J., Fishman, J. A. and Patience, C. 2004. Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine. *J Virol* 78(5):2494-501.
 25. 김영봉, 유재영, 이종영, 김계웅, 박홍양. 2004. Prevalence of PERVs from Domestic Pigs in Korea (pol gene sequences) *한국동물자원과학회지* 46(3): 307-314.
- (접수일자 : 2005. 2. 21. / 채택일자 : 2005. 4. 12.)