

돼지 유전체 염기서열을 이용한 내인성 리트로 바이러스 분석에 관한 연구

유성란¹ · 이준현^{1*}

In silico Analysis of PERVs Based on the Porcine Genomic Sequence Information

Seong-Lan Yu¹ · Jun Heon Lee^{1*}

ABSTRACT

This study was conducted to identify the PERV (Porcine Endogenous Retrovirus) integration sites and their characterizations using the porcine genomic sequence information. Total 114 Mb (4.2%) sequence of the 2.7 Gb pig genome was investigated for the PERV sequences. As the results, 8 PERV sequences were identified and their genomic structures were deduced from the BLAST searches against previously known PERV genes. Seven PERVs have internal deletions in the protein coding region and they will not be functional. The other one also has internal deletions in the *gag* and *env* genes, indicating this PERV is also defective. Even though we could not identify the functional PERVs in this study, the results presented here can be used for the fundamental research materials for controlling PERV infections in relation to xenotransplantation using porcine organs and tissues.

Key words: Porcine Endogenous Retrovirus, Integration site, Xenotransplantation

2009년 09월 28일, 접수: 2009년 10월 23일, 수정: 2009년 12월 08일 채택

¹ 충남대학교 농업생명과학대학 동물자원생명과학전공(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

* 교신저자: 이준현(E-mail: junheon@cnu.ac.kr, Tel: +82-42-821-5779)

I. 서 론

의학기술이 발달함에 따라 사람의 장기를 이식하는 성공률이 증가하였으나 장기를 제공할 수 있는 공여자에 비해 수여자의 수가 매우 많아 장기 이식을 기다리는 동안 많은 환자가 사망에 이르고 있다. 이런 장기이식의 대기자를 줄이기 위하여 1990년 이후 생물학적으로나 해부학적으로 사람과 유사한 돼지의 장기를 이용하여 사람에게 장기를 이식하고자 하는 이종장기이식(xenotransplantation)에 대한 관심이 증가하게 되었으며 이에 대한 연구도 급속도로 진행되고 있다. 그러나 이종장기 이식에 있어서 여러 가지의 문제점 중 돼지 genome내에 존재하는 내인성 리트로바이러스(porcine endogenous retrovirus: PERV)는 돼지에서 사람으로 새로운 바이러스를 전파시킬 수 있다는 가능성이 제기된 후 이종간 장기이식에서 꼭 풀어야 하는 문제로 인식되고 있으며 PERV 감염에 대한 안정성이 확보되지 않는 한 돼지를 이용한 이종간 장기이식은 매우 어려울 것으로 인식되고 있다(Patience 등, 1997; Wilson 등, 1998).

PERV는 gamma retrovirus에 속하며 바이러스 core 단백질을 만드는 gag, 역전사효소(reverse transcriptase)를 만들어내는 pol 및 바이러스 envelope를 만드는 env의 3가지의 유전자로 구성되어 있다. 이 중 env유전자는 염기서열상의 변이(sequence variation)가 두 유전자에 비해 많아 이를 통해 PERV-A, -B 및 -C type으로 분류되어진다(Patience 등, 2001). 이 type들 중 PERV-A와 B는 사람에게 감염이 가능한 형태이고 PERV-C는 단지 돼지에서만 감염이 가능한 것으로 알려져 있었다. 그러나 최근 연구결과에 의하면 PERV-C type은 A type과 recombination

이 일어나 A/C type의 형태를 이루어 사람에게 감염이 가능한 것으로 보고되었다 (Denner 등, 2008). 이러한 PERV는 돼지 genome내에 약 30-50 copy정도가 존재하는 것으로 보고되어졌고(Le Tissier 등, 1997), Gorbovitskaia 등(2003)에 의해 품종마다 PERV가 삽입되어 있는 위치(integration loci)가 다름을 보고하였다. 그러나 현재까지 알려진 PERV의 염색체상 위치는 *in situ* hybridization 또는 radiation hybrid panel의 결과에 의한 것으로 염기서열에 기초한 정확한 위치를 아는 PERV는 매우 한정되어 있다. 따라서 PERV가 삽입되어 있는 정확한 위치를 알기 위해서는 돼지의 genomic sequence 정보에 기초한 분석이 필요하다. 현재 돼지는 미국 및 영국의 주도하에 pig genome project가 진행 중에 있으며 2009년 10월 현재까지 총 2.7 Gb인 돼지의 genome 염기서열 중 4.2%인 114 Mb의 염기서열을 확인하고 이를 보고하였다 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/). 따라서 본 연구는 현재까지 발표된 돼지의 genomic sequence 정보를 이용하여 PERV들의 정확한 삽입 위치를 파악하고 그들의 특성을 분석하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

NCBI database에 보고된 PERV의 존재 유무 확인

Porcine genome project에 의해 보고된 PERV의 존재유무를 확인하기 위해 기존에 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 보고된 PERV-A(AY099323; Bartosch 등, 2002), -B(AY099324; Bartosch 등, 2002) 및 -C(AF038600; Akiyoshi

등, 1998)를 reference sequence로 이용하여 현재 까지 보고된 돼지의 assembled genome(Sscrofa5: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에 BLAST를 실시하여 PERV의 존재 여부를 확인 하였다. BLAST 결과에서 얻어진 clone들의 염 색체 위치는 NCBI의 Map Viewer(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9823)로 확인하였다.

각 PERV의 특성 분석

BLAST에 의해 얻어진 8개의 genomic sequence 내에 PERV가 어느 부위에 포함되어 있는지를 확인하기 위하여 각 sequence들에서 PERV부분을 NCBI GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>)에서 확인하였으며 그 염기서열은 ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>; Higgins 등, 1994)를 이용하여 현재 보고되어 있는 PERV-A, -B 및 -C와 함께 alignment를 실시하여 각각의 PERV가 어떠한 형태로 genome내에 삽입되어 있는지를 확인하였다. 염기서열을 이용하여 PERV 유전자의 구조를 확인한 다음 각 PERV들이 단백질을 제대로 만들 수 있는지를 NCBI의 ORF finder (Open Reading Frame finder: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)를 이용하여 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

NCBI database에 보고된 PERV의 존재 유무 확인

2003년 결성된 Swine Genome Sequencing Consortium(SGSC)에서 시작된 돼지의 genome project는 2009년에 모든 돼지의 염기서열을 확인

하기 위한 마무리 작업을 하고 있다. 따라서 현재 돼지의 genome 염기서열은 계속해서 database에 보고되고 있다. 본 논문은 현재까지 database에 보고되어 있는 염기서열을 이용하여 돼지 genome 내에 몇 개의 PERV가 존재하고 그 형태는 어떤 지 확인하기 위하여 실시하였다. 이미 NCBI에 보고되어 있는 PERV-A(AY099323; Bartosch 등, 2002), -B(AY099324; Bartosch 등, 2002) 및 -C(AF038600; Akiyoshi 등, 1998)의 염기서열을 바탕으로 하여 돼지의 assembled genomes에 BLAST한 결과는 표 1에 나타난 바와 같다. 표 1에서 보면 PERV-A, -B 및 -C type을 이용한 결과가 중복되는 것을 확인할 수 있는데 이것은 PERV의 각 type들이 gag와 pol유전자는 일치하고 단지 env부위만이 약 90%정도의 상동성(homology)을 가지기 때문에 이와 같은 결과를 나타냈다고 생각한다. 그리고 score가 1000이하인 clone들은 PERV의 염기서열이 아닌 PERV의 유전자들 중 LTR부위만이 상동성이 있는 것으로 나타났다. LTR은 virus에서 발현 및 숙주 염색체(host chromosome) integration에 중요한 부위로써 RNA virus들은 long terminal repeats(LTRs)를 가지고 있다. 따라서 LTR을 제외하고 현재까지 porcine genome project (version Sscrofa5)에서 확인할 수 있는 PERV sequence는 8개임을 확인할 수 있었다. 이 8개의 sequence를 이용하여 PERV가 어느 염색체에 존재하는지를 NCBI의 Map Viewer로 확인한 결과 그림 1와 같이 SSC1에 3개, SSC4에 1개, SSC7에 1개, SSC14에 1개 및 SSC X에 2개 총 8개가 염색체의 서로 다른 부분에 존재함을 확인할 수 있었다. 현재 돼지의 전체 genome 크기가 총 2.7 Gb인 것을 감안하며 전체 genome의 4.2%인 114 Mb만이 보고되어 있기 때문에 8개의 PERV가 확인된 것

이고 만약 100% 염기서열이 밝혀진다면 Le 30-50 copy보다 매우 많은 PERV가 돼지 genome Tissier 등(1997)의 Southern 결과에서 보고한 내에 산재되어 있을 것으로 사료된다.

Table 1. BLAST search results using the known PERV-A, -B and -C sequences.

Type of PERVs (Accession No.)	BLAST results	Score (Bits)	E-value
PERV-A (AY099323)	NW_001886051	9533	0.0
	NW_001886203	6800	0.0
	NW_001885844	4649	0.0
	NW_001886549	4289	0.0
	NW_001886099	4019	0.0
	NW_001886689	3435	0.0
	NW_001886636	3022	0.0
	NW_001885476	2955	0.0
	NW_001886461	981	0.0
	NW_001885718	920	0.0
	NW_001885739	861	0.0
	NW_001885416	793	0.0
	NW_001886302	654	0.0
	NW_001885525	645	0.0
PERV-B (AY099324)	NW_001886203	1.109e+04	0.0
	NW_001886051	6052	0.0
	NW_001886099	5596	0.0
	NW_001886689	4872	0.0
	NW_001886549	3932	0.0
	NW_001885844	3432	0.0
	NW_001886636	3029	0.0
	NW_001885476	2955	0.0
	NW_001886461	996	0.0
	NW_001885718	935	0.0
	NW_001885739	874	0.0
	NW_001885416	808	0.0
	NW_001886302	654	0.0
	NW_001885525	645	0.0
PERV-C (AF038600)	NW_001886051	6447	0.0
	NW_001886203	6340	0.0
	NW_001886549	4132	0.0
	NW_001885844	3777	0.0
	NW_001885476	3456	0.0
	NW_001886636	2723	0.0
	NW_001886099	1986	0.0
	NW_001886689	1552	0.0

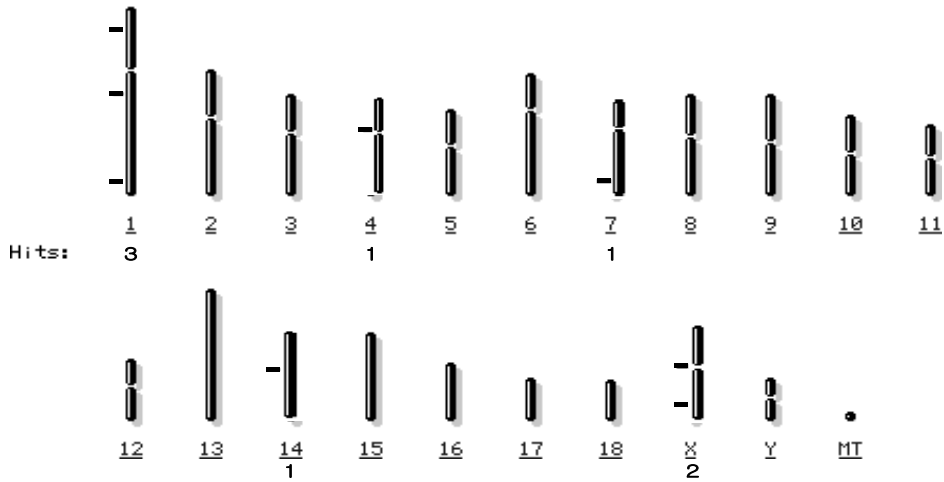


Figure 1. Chromosomal locations of PERVs based on the BLAST search results. Black bars indicate PERV locations.

각 PERV의 특성 분석

Retrovirus들은 RNA virus로 역전사효소(reverse transcriptase)에 의해 숙주(host cell)의 genome 내 삽입되어 DNA 형태로 존재한다. 이 retrovirus genome은 약 7-10 kb로 5' 과 3' LTR, gag, pol 및 env 유전자로 구성되어 있다. 본 연구에서 확인된 8개의 PERV sequence가 완전한 PERV sequence를 가지고 있는지를 확인하기 위하여 기존에 NCBI에 보고된 PERV-A, -B 및 -C type 과 alignment를 실시하였다. 그 결과 그림 2와 같이 8개의 PERV중 NW_001886203 sequence로부터 확인된 1개의 PERV만이 deletion 없이 완전한 구조를 가지고 있는 것을 확인하였다. PERV가 발현되어 다른 숙주에 감염시키기 위해서는 gag, pol 및 env의 유전자가 정상적인 단백질을 만들어 virus의 형태를 가져야 하는데 만약 각각의 유전자 내에 점돌연변이(point mutation)가 생겨 stop codon이 생기게 되면 완전한 virus의 역할을 할 수 없게 된다. 따라서 본 연구에서

밝혀진 1개의 PERV 유전자에 돌연변이가 생겼는지를 알아보기 위해서 NW_001886203 PERV로부터 gag, pol 및 env의 유전자의 염기서열을 찾아내고 각각의 유전자의 염기서열을 ORF finder을 이용하여 아미노산 염기서열을 예측하였다. 그 결과 그림 2와 같이 gag와 env 유전자에 돌연변이가 생겨 완전한 단백질을 만들 수 없는 것이 확인되었다. 나머지 7개의 PERV 유전자들 중 gag, pol 및 env 염기서열을 가지고 있는 것들도 확인한 결과 모두 단백질을 발현할 수 없는 것이 확인되었다. 본 연구를 통하여 많은 수의 PERV가 돼지의 genome내에는 존재하고 있지만 대부분의 PERV는 감염이 가능하지 않은 상태로 존재한다는 것을 확인하였다. 그러나 최근 Denner(2008)의 보고에 의하면 PERV간 recombination type인 A/C type이 확인되었기 때문에 각각의 PERV가 defective 형태로 존재한다고 해도 recombination에 의해 발현이 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 사람에게 인공장기를

제공해 주기 위해서는 PERV의 발현을 완전히 억제하는 방법을 모색해야 할 것으로 생각된다 (Ramsoondar 등, 2009).

IV. 적 요

본 연구는 현재까지 발표된 돼지의 genomic sequence 정보를 이용하여 PERV들의 정확한 삽입 위치를 파악하고 그들의 특성을 분석하고자

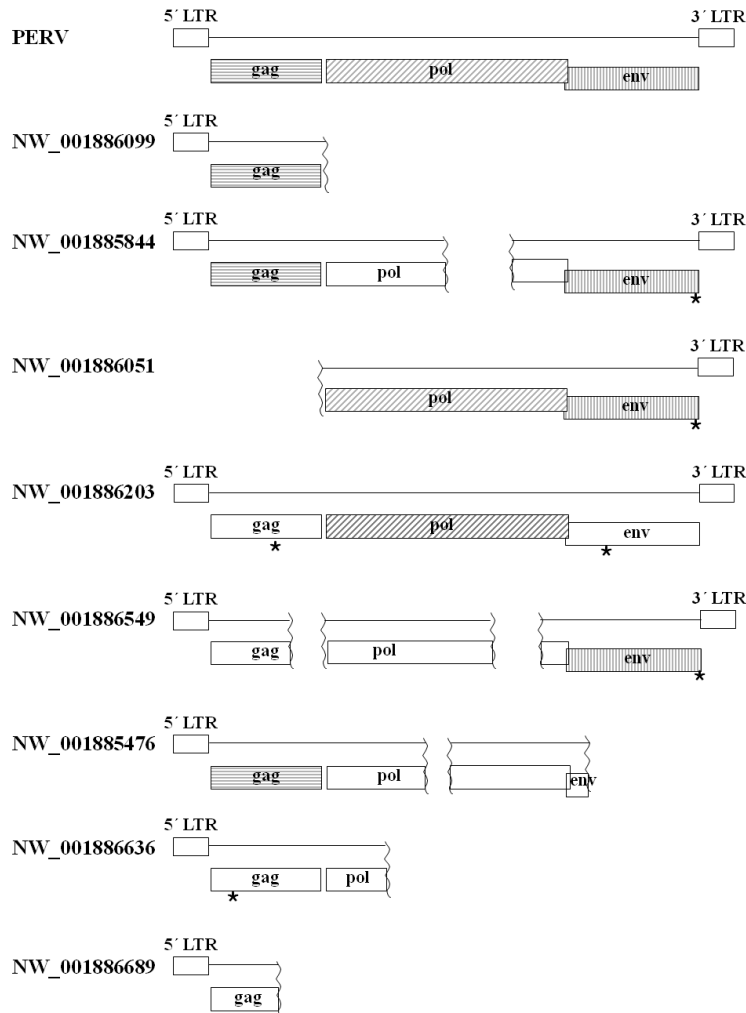


Figure 2. PERVs structures based on the BLAST search results. Gray rectangles indicated that they can express mature proteins. The internal stop codon is shown as asterisk(*).

실시하였으며 총 2.7 Gb인 돼지 genome 염기서열 중 4.2%인 114 Mb의 염기서열에서 PERV sequence를 확인한 결과 총 8개의 PERV sequence를 확인할 수 있었다. 확인된 PERV sequence중 7개는 유전자내에 deletion이 확인되었으며 나머지 한 개의 PERV도 gag와 env 유전자에 stop codon이 확인되어 정상적인 PERV로 발현되지 않을 것으로 추정되었다. 본 연구는 돼지를 이용한 이종장기이식과 관련하여 PERV를 제어하기 위한 중요한 기초 연구 자료를 제공할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(No. 20070401034031)의 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Akiyoshi, D. E., M. Denaro, H. Zhu, J. L. Greenstein, P. Banerjee and J. A. Fishman. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* 72 : 4503-4507.
2. Bartosch, B., R. A. Weiss and Y. Takeuchi. 2002. PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J. Gen. Virol.* 83 : 2231-2240.
3. Denner, J. 2008. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation. *Arch. Virol.* 153 : 1421-1426.
4. Gorbovitskaia, M., Z. Liu, N. Bourgeaux, L. Ning, Z. Lian, P. Chardon and C. Rogel-Gaillard. 2003. Characterization of two porcine endogenous retrovirus integration loci and variability in pigs. *Immunogenetics* 55 : 262-270.
5. Higgins D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 : 4673-4680.
6. Le Tissier, P., J. P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience and R. A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389 : 681-682.
7. Patience, C., W. M. Switzer, Y. Takeuchi, D. J. Griffiths, M. E. Goward, W. Heneine, J. P. Stoye and R. A. Weiss. 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75 : 2771-2775.
8. Patience, C., Y. Takeuchi and R. A. Weiss. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3 : 282-286.
9. Ramsoondar J., T. Vaught, S. Ball, M. Mendicino, J. Monahan, P. Jobst, A. Vance, J. Duncan, K. Wells and D. Ayares. 2009. Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation*, 16(3) : 164-180.
10. Wilson, C., S. Wong, J. Muller, C. Davidson, T. Rose and P. Burd. 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72 : 3082-3087.