

< Original Article >

국내 양돈장에서 분리한 G9형 돼지로타바이러스의 특성

왕권후이¹ · 이승철² · 강신영^{1*}

¹충북대학교 수의과대학, ²(주)중앙백신연구소

Characterization of G9 genotype porcine rotavirus isolated in Korea

Jun-Hui Wang¹, Seung-Chul Lee², Shien-Young Kang^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Choongang Vaccine Laboratories, Daejeon 305-348, Korea

(Received 20 April 2012; revised 24 May 2012; accepted 30 May 2012)

Abstract

Porcine rotaviruses are the most common causes of viral gastroenteritis in piglets around the world. The major G genotypes of porcine rotaviruses causing diarrhea were G4, G5 and G11 genotypes. Recently, G9 genotype rotaviruses were problemated at swine farms and frequently recognized from diarrhetic piglets. In this study, a porcine rotavirus (PoRV-1) was isolated from piglet showing diarrhea using MA104 cells and confirmed as rotavirus by electron microscopy, genomic RNA electropherotyping and indirect immunofluorescence antibody tests. The nucleotide sequence of the VP7 gene of PoRV-1 was determined and compared with those of other genotype rotavirus strains from other parts of the world. Also, the nucleotide sequences of VP4, VP6 and NSP4 genes of PoRV-1 were determined and compared with those of other rotavirus strains from other countries. The results showed that the PoRV-1 isolate belonged to the G9 genotype and the P, I and E genotypes of PoRV-1 were P[23], I5 and E1, respectively. The Korean G9 PoRV-1 isolate and its nucleotide sequence data would be usefully used for the development of porcine rotavirus vaccines in near future.

Key words : G9 porcine rotavirus, VP4, VP6, VP7, NSP4 genes

서 론

로타바이러스는 돼지를 포함한 어린 포유동물과 조류에서 설사를 주 증상으로 하는 급성장염의 주요 원인체로 알려졌다(Estes와 Kapikian, 2007). 로타바이러스는 *Reoviridae*과에 속하는 직경 70 nm 정도의 정이십면체 형태의 바이러스로 triple-layered capsid를 가지며 core에는 분절로 되어 있는 11개의 이중가닥 RNA (dsRNA)로 구성된 유전자가 존재한다. 11개의 분절로 되어 있는 로타바이러스 유전자는 6개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 6개의 비구조단백질(NSP1-NSP6)을 암호화하고 있다(Estes 등,

1983; Estes와 Cohen, 1989; Estes와 Kapikian, 2007). 로타바이러스의 구조단백질 중 VP6는 안쪽 capsid를 구성하는 중요한 단백질로 core capsid 단백질인 VP2와 바깥쪽 capsid 단백질인 VP4/VP7과 상호작용하며, 모든 로타바이러스에는 공통 항원부위가 존재하기 때문에 항원검출을 목적으로 하는 진단에 주 표적이 되고 있다(Prasad 등, 1988; Chen 등, 1992). VP4는 바깥쪽 capsid에 존재하는 spike 단백질로 바이러스 복제 시 단백질 분해효소에 의해 VP8과 VP5로 잘려 감염력이 증가하는 것으로 알려졌다(Dormitzer 등, 2004; Monnier 등, 2006). VP7은 바깥쪽 capsid의 표면을 구성하는 당단백질로 VP4와 함께 중화항체 형성에 관여하며 로타바이러스 감염에서 방어에 중요한 역할을 한다. NSP4는 RNA와 결합하지 않고 소포체 내로

*Corresponding author: Shien-Young Kang, Tel. +82-43-261-2598,
Fax. +82-43-267-2595, E-mail. sykang@chungbuk.ac.kr

이동하여 바이러스 복제 시 조립에 관여하는 세포 내 수용체로서 중요한 역할을 하며 최근에는 calcium-dependent signal transduction pathway를 통해 chloride 분비를 유도하는 장독소의 역할을 한다고 알려졌다 (Tafazoli 등, 2001).

초기에 로타바이러스는 capsid 단백질의 항원성에 따라 군(group), 아군(subgroup) 그리고 혈청형(serotype)으로 분류되었다(Estes 등, 1983; Estes와 Kapikian, 2007). 로타바이러스 군은 혈청학적 방법에 의하여 교차반응이 있는 VP6의 항원성에 따라 7개의 군(A-G)으로 분류되며, 돼지에서는 A, B 그리고 C군이 보고되고 있으나 대부분의 로타바이러스성 설사는 A군에 의하여 일어난다(Estes와 Kapikian, 2007; Yolken 등, 1988). 또한, 로타바이러스의 바깥 capsid를 구성하고 있는 단백질인 VP7과 VP4는 독립적으로 중화항체를 유도하며 이들의 항원성에 따라서 각각 G 혈청형과 P 혈청형으로 구분하였으나 최근에는 염기서열의 차이에 의한 G 유전자형(G genotype)과 P 유전자형(P genotype)의 분류체계가 보편적으로 사용되고 있다. 돼지에서는 4개의 G 유전자형(G3, G4, G19 그리고 G11)과 2개의 P 유전자형(P[6]와 P[7])이 주로 빈번하게 분리되었으나 최근에는 G1, G2, G6, G8, G9 그리고 G10 유전자형과 P[8] 등, P[13] 등, P[19] 등, P[23] 등, P[26] 그리고 P[27] 유전자형이 돼지에서 확인되었다(Bellinzoni 등, 1990; Huang 등, 1993; Liprandi 등, 2003; Martella 등, 2001; Pongsuwan나 등, 1996; Rosen 등, 1994).

이번 연구에서는 최근 미국 등 선진국에서 주요한 혈청형으로 보고되고 있는 G9형 돼지로타바이러스를 MA104 세포를 이용하여 순수 분리한 후, 분리된 G9

형 로타바이러스의 분자생물학적 특성을 규명하고 외국에서 보고된 동일 혈청형의 로타바이러스와의 유전자 비교분석을 통해 국내 분리 돼지로타바이러스의 분자역학적 자료 확보 및 차후 G9형 돼지로타바이러스의 백신주를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

로타바이러스 분리 및 확인

2010년 충남 홍성에 있는 돼지농장에서 심한 설사 증상을 보이는 28일령의 어린 돼지로부터 분변을 채취하여 바이러스 분리에 사용하였다. 원숭이신장세포 유래인 MA104 세포는 5% 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)(Invitrogen, USA)과 gentamycin sulfate (KukJe, South Korea)가 첨가된 α -minimum essential medium (α -MEM)(Invitrogen, USA)을 사용하여 배양하였으며 돼지로타바이러스 분리는 Sato 등(1981)과 Kang 등(1986)의 방법에 따라 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 즉, 항생제가 첨가된 α -MEM으로 설사분변을 10% (w/v) 희석하여 3,000 rpm에서 10분간 원심한 후, 상층액만을 취하여 0.2 μ m syringe filter로 여과하였다. 여과한 분변가검물에 trypsin (Sigma, USA)을 최종농도가 10 μ g/ml이 되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 단층이 형성된 MA104 세포를 α -MEM으로 2회 세척한 후, trypsin 처리된 분변가검물은 접종하여 37°C에서 1시간 흡착시켰다. 흡착 후 α -MEM으로 1회 세척하고 1 μ g/ml의 trypsin이 첨가된 α -MEM을 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 7일간 회전

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Polarity	Sequence (5'→3')	Position*	Size (bp)
VP4	Sense	GGCTATAAAATGGCTTCGCT	1~20	887
	Antisense	GACCACTTATACCCTAGACCAC	866~887	
	Sense	GAGCTCAGGCGAATGAAGAT	752~771	991
	Antisense	CTCGAAATTGATGAAGCAGCG	1,722~1,742	
	Sense	GTGCCATCGAATGACGATTAT	1,432~1,452	931
	Antisense	GGTCACATCCTCTGTACGTT	2,343~2,362	
VP6	Sense	GGCTTTTAAACGAAGTCTTCATCATGG	1~27	1,353
	Antisense	GGTCACATCCTCTCACTATACTGCTG	1,328~1,353	
VP7	Sense	GGCTTTAAAAGAGAGAAATTCC	1~22	1,063
	Antisense	GGTCACATCATAACAATTCTAATC	1,041~1,063	
NSP4	Sense	GGCTTTTAAAAGTTCTGTCCGAG	1~24	754
	Antisense	GGTCACATTAAGACCGTTCCTT	733~754	

*The position of each primer was determined based on GenBank accession No.: JQ343833~JQ343836.

배양하였다. 배양 7일 동안 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가 나타나는지를 관찰하고 CPE가 나타나지 않을 때 감염세포를 3회 얼리고 녹이는 과정 후, 위와 같은 방법으로 blind passage를 수행하였다. CPE가 확인된 바이러스는 plaque assay법을 3회 연속 실시하여 로타바이러스를 순수 분리하였다. 순수 분리된 바이러스는 단클론항체를 이용한 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody technique, IFA) (Shaw 등, 1992), 전자현미경(Carl Zeiss, Libra 120, Germany) 관찰 및 RNA electrophoretotyping법을 이용하여 로타바이러스로 최종적으로 확인하였으며, VP4, VP6, VP7 및 NSP4 유전자 염기서열 확인에 사용하였다.

로타바이러스의 분자생물학적 특성

Primer 제조: 로타바이러스의 VP4, VP6, VP7 그리고 NSP4 유전자 염기서열 확인을 위한 primer는 GenBank의 data를 기초로 하여 Table 1과 같이 제작하였다(GenBank accession Number: JQ343833~JQ343836).

RNA 추출 방법: Viral RNA는 QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 추출하여 각각의 유전자 cDNA 합성에 사용하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): 각각의 유전자에 대한 cDNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 사용하여 다음과 같이 합성하였다. 즉, 추출한 viral RNA 5 µl에 dNTP mixture (10 mM) 1 µl, 각각의 유전자 sense 및 antisense primer (10 pM/µl) 1 µl, 5× PrimeScript buffer 4 µl, RNase inhibitor (40 U/µl) 0.5 µl, PrimeScript RT (200 U/µl) 1 µl, 그리고 RNase free 증류수 6.5 µl를 넣어 전체 반응용량 20 µl를 42°C에서 60분 그리고 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였으며 합성된 cDNA는 VP4, VP6, VP7 그리고 NSP4 유전자 증폭을 위해 사용하였다.

VP4와 VP7 유전자를 증폭하기 위하여 각각의 유전자에 대하여 합성된 cDNA 5 µl에 10× ExTaq buffer (Takara, Japan) 4 µl, Taq DNA polymerase (5 U/µl; Takara, Japan) 1 µl, VP4와 VP7 유전자에 특이적인 sense 및 antisense primer (10 pM/µl) 각각 1 µl, 2.5 mM dNTP 3 µl 그리고 RNase free 증류수 25 µl를 넣어 전체 반응용량 40 µl를 핵산증폭기(Takara, Japan)를 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation하였다. 이어 95°C에서 1분, 51°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초간 35

회의 cycle로 증폭하고 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다.

VP6 유전자와 NSP4 유전자의 경우, PCR 반응 조건 중 annealing 온도만 VP6 유전자는 57°C 그리고 NSP4 유전자는 53°C로 수행하고 다른 조건은 모두 VP4와 VP7 유전자의 증폭과 같은 방법으로 수행하였다. PCR 반응 후, 증폭한 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 증폭 유무를 확인하였다.

유전자 염기서열 분석: 국내 분리 로타바이러스 VP4, VP6, VP7 그리고 NSP4 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 PCR 반응산물을 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하여 염기서열분석회사(Cosmogentec, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 결정된 PoRV-1 strain의 VP4, VP6, VP7 그리고 NSP4 유전자의 염기서열은 Clustal_X (1.7) program을 이용하여 NCBI GenBank data bases에 등록된 group A 로타바이러스들의 유전자 염기서열과 다중 정렬하여 유사성 행렬을 구하였다. 다중정렬한 염기서열은 PHYLIP package를 이용하여 계통수를 작성하여 phylogenetic tree는 neighbour-joining algorithm을 이용하여 작성하였다(DNASTAR, Madison, USA).

결 과

로타바이러스의 분리 및 확인

로타바이러스 진단용 rapid 진단키트를 사용하여 로타바이러스로 확인된 분변시료를 MA104 세포에

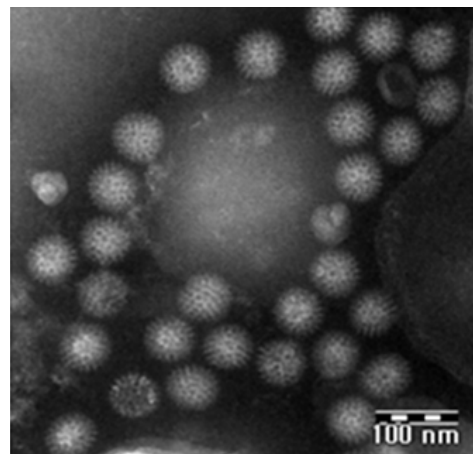


Fig. 1. Electron micrograph of cell culture-adapted PoRV-1 isolates.

접종하여 바이러스 순수 분리를 시도한 결과, 로타바이러스를 분리할 수 있었다. 분리된 바이러스는 MA104 세포에서 2번째 계대배양에서 로타바이러스 특유의 CPE를 나타냈으며 plaque purification 법으로 순수 분리된 바이러스를 PoRV-1 strain으로 명명하였다.

순수 분리된 PoRV-1 바이러스를 MA104 세포에서 배양한 후 바이러스를 농축 정제하여 negative staining하여 전자현미경으로 관찰한 결과, Fig. 1과 같이 로타바이러스 특유의 수레바퀴 모양인 직경 70 nm 크기의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 분리한 바이러스의 RNA 전기영동 pattern을 확인하기 위하여 RNA electropherotyping을 실시한 결과, Fig. 2와 같이 로타바이러스 특유의 11개 band를 관찰할 수 있었으며 돼지로타바이러스 표준주로 사용한 Gottfried와 OSU strain과는 달리 10번째와 11번째 유전자는 short pattern을 보였다. 또한, 로타바이러스 특이 단백항체를 이용하여 간접형광항체법으로 확인한 결과, 순수 분리된 바이러스가 감염된 MA104 세포에서 세포질 내에 특이적인 형광을 나타내어 로타바이러스로

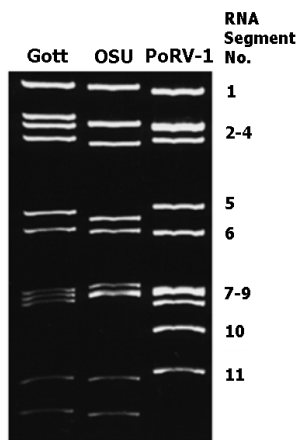


Fig. 2. Polyacrylamide gel electropherotypes of cell culture-adapted PoRV-1 isolate. The RNA segments of the Gottfried and OSU strain are shown.

확인할 수 있었다(Fig. 3).

로타바이러스의 분자생물학적 특성

국내 분리 로타바이러스 PoRV-1 strain의 VP4, VP6, VP7 그리고 NSP4 유전자의 전체 염기서열을 결정하여 NCBI GenBank에 등록한 후, 각각 accession number JQ343833, JQ343834, JQ343835, 그리고 JQ343832로 지정받았다.

VP7 유전자 염기서열: 국내 분리 PoRV-1 로타바이러스 VP7 유전자를 분석한 결과, VP7 open reading frame (ORF)는 모두 981개의 염기서열로 구성되었으며 326개의 아미노산을 encode하는 것으로 확인되었다. 또한, PoRV-1의 VP7 유전자 염기서열과 GenBank에 등록된 외국분리주의 VP7 유전자와 상관성을 조사한 결과, PoRV-1과 group A에 속하는 로타바이러스의 상동성의 범위는 61.4~92.3% 범위로 나타났다. 특히, G9 genotype에 속하는 사람과 돼지로타바이러스와는 각각 86.7~87.1%와 90.7~92.3%의 비교적 높은 상동성을 나타냈으나 G7 genotype에 속하는 조류로타바이러스 Ch-2와는 61.4%의 낮은 상동성을 나타내었다(Fig. 4).

VP4 유전자 염기서열: 국내 분리 PoRV-1 로타바이러스 VP4 유전자를 분석한 결과, VP4 ORF는 모두 2,334개의 염기서열로 구성되었으며 777개의 아미노산을 encode하는 것으로 확인되었다. Genotype G9으로 확인된 PoRV-1에 대한 VP4 유전자 염기서열과 다른 P 유전자형과의 유전적 상관성을 조사하기 위하여 VP7 유전자 분석과 같은 방법으로 조사하였다. Group A 로타바이러스의 P 유전자형과 유사성을 비교 분석한 결과, PoRV-1의 유전자형은 P[23]로 확인되었으며 같은 P 유전자형간의 상동성은 88.4~94.9%로 나타났고, 서로 다른 P 유전자형간의 상동성은 62.5~75.3%로 나타났다. 계통유전학적 분석결과, PoRV-1은 국내에서 보고된 돼지로타바이러스 PRG921

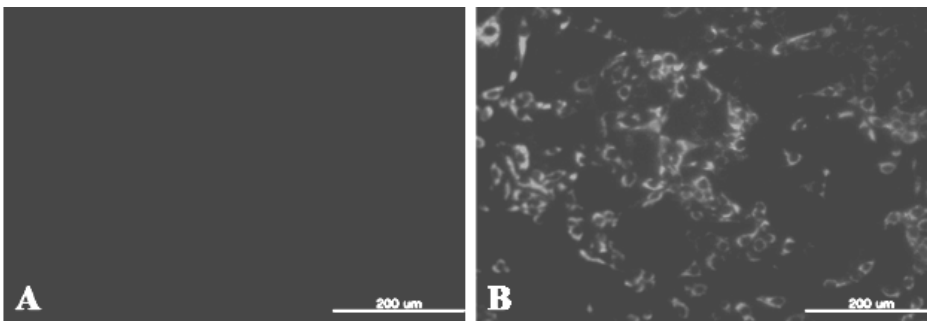


Fig. 3. Immunofluorescence of mock (A) and PoRV-1 infected (B) MA104 cells using rotavirus specific monoclonal antibodies.

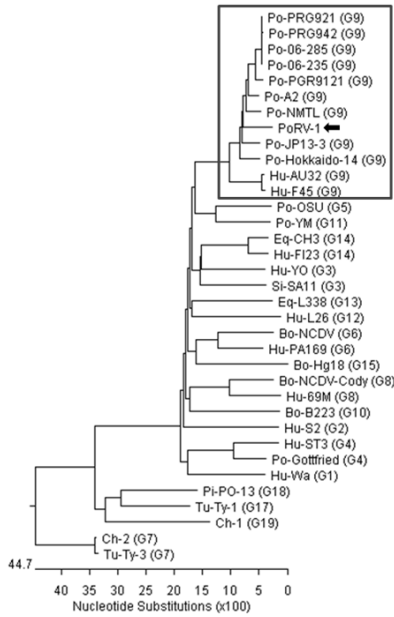


Fig. 4. Phylogenetic tree of the complete VP7 gene of a Korean porcine rotavirus (PoRV-1) and other representative G genotype rotavirus strains. Po: porcine, Hu: human, Eq: equine, Si: simian, Bo: bovine, Pi: pigeon, Tu: turkey, Ch: chicken. The number in parentheses indicates the G genotype and viral strains in box belong to the same genotype.

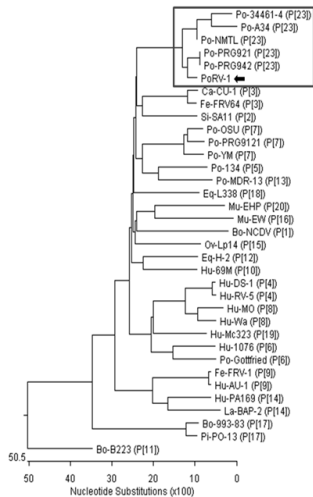


Fig. 5. Phylogenetic tree of the complete VP4 gene of a Korean porcine rotavirus (PoRV-1) and other representative P genotype rotavirus strains. Po: porcine, Fe: feline, Si: simian, Eq: equine, Mu: murine, Hu: human, Bo: bovine, Ov: ovine, La: lapine, Pi: pigeon, Tu: turkey, Ch: chicken. The number in parentheses indicates the P genotype and viral strains in box belong to the same genotype.

과 PRG942과 각각 95.0%와 94.9%의 상동성을 나타내지만, 일본과 중국에서 분리된 돼지로타바이러스 34461-4, A34 그리고 NMTL과는 88.4~90.1%의 상동

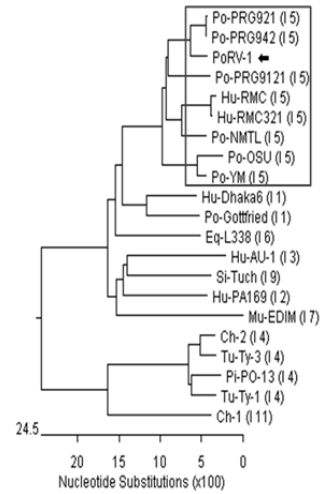


Fig. 6. Phylogenetic tree of the complete VP6 gene of a Korean porcine rotavirus (PoRV-1) and other representative I genotype rotavirus strains. Hu: human, Po: porcine, Eq: equine, Si: simian, Mu: murine, Pi: pigeon, Tu: turkey, Ch: chicken. The number in parentheses indicates the I genotype and viral strains in box belong to the same genotype.

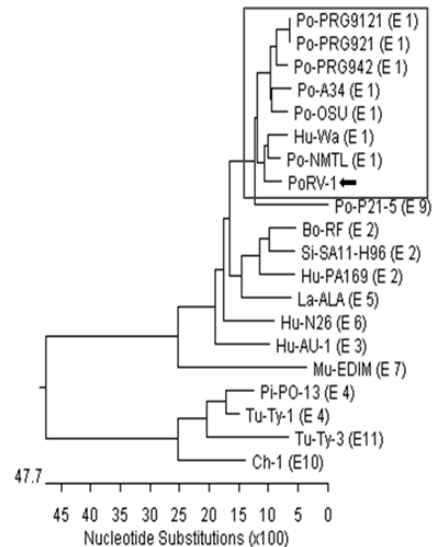


Fig. 7. Phylogenetic tree of the complete NSP4 gene of a Korean porcine rotavirus (PoRV-1) and other representative E genotype rotavirus strains. Hu: human, Po: porcine, Bo: bovine, Si: simian, La: lapine, Mu: murine, Pi: pigeon, Tu: turkey, Ch: chicken. The number in parentheses indicates the E genotype and viral strains in box belong to the same genotype.

성을 보여 P[23] 유전자형 내에 서로 다른 cluster를 이루고 있었다(Fig. 5).

VP6 유전자 염기서열: 국내 분리 PoRV-1 로타바이러스 VP6 유전자를 분석한 결과, VP6 ORF는 모두

1,191개의 염기서열로 구성되어 있으며 396개의 아미노산을 encoding하고 있었다. PoRV-1 VP6 유전자를 GenBank에 보고된 동물과 사람 로타바이러스 VP6 유전자의 염기서열과 다중 정렬하여 비교한 결과, 같은 유전자형 I5에 속하는 바이러스의 유전자와는 89.9~96.3%의 상동성을 보였으며, 다른 유전자형과는 66.9~84.68%의 상동성을 보였다. 국내에서 분리된 PoRV-1 strain 로타바이러스는 국내에서 보고된 PRG9121 (91.2%)과 중국에서 보고된 NMTL (90.7%)보다 국내에서 분리 보고된 다른 로타바이러스주인 PRG921 그리고 PRG942 (90.5~90.9%)과 유전자의 유사성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 6).

NSP4 유전자 염기서열: 국내 분리 PoRV-1 로타바이러스 NSP4 유전자를 분석한 결과, NSP4 ORF는 모두 528개의 염기서열로 구성되어 있으며 175개의 아미노산을 encoding 하였다. PoRV-1 strain NSP4 유전자와 국내 및 국외에서 보고된 동물 및 사람로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열을 다중 정렬하여 비교한 결과, 같은 유전자형 E1에 속하는 바이러스의 유전자와는 90.5~94.5%의 상동성을 보였으며, 다른 유전자형과는 55.3~85.8%의 상동성을 보였다. 국내에서 분리된 PoRV-1는 국내에서 보고된 PRG9121, PRG921 그리고 PRG942 (90.5~90.9%)보다는 중국에서 보고된 NMTL (94.5%)과 유사한 것으로 나타났다(Fig. 7).

고 찰

돼지로타바이러스는 자돈에서 설사를 주 증상으로 하는 장염의 원인체로 양돈산업에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 설사자돈에서 주로 G3, G4, G5 그리고 G11 유전자형의 로타바이러스가 주로 분리되었으며 이들 유전자형은 P[6]와 P[7] 유전자형과 조합을 이루고 있다(Rosen 등, 1994). 최근에는 G9 유전자형 로타바이러스가 돼지에서도 빈번히 검출되고 있다(Collins 등, 2010, Okitsu 등, 2011; Teodoroff 등, 2005). 이 연구에서는 2010년 로타바이러스 양성으로 확인된 돼지 분변샘플을 이용하여 조직배양법을 통해 돼지로타바이러스를 순수분리하고, 분리된 로타바이러스의 주요 유전자인 VP4, VP6, VP7 및 NSP4의 염기서열을 확인하여 기존에 보고된 사람을 포함한 여러 동물유래 로타바이러스들의 염기서열 간에 유전적 상관관계를 조사하였다.

로타바이러스 분리 및 배양에 MA104 세포가 일반

적으로 널리 사용되고 있으며 Sato 등(1981)은 사람로타바이러스를 분리하는데 MA104 세포를 사용하여 바이러스를 trypsin으로 처리하고 배지 중에 trypsin을 첨가함으로써 분변 시료로부터 바이러스를 직접 분리할 수 있었다. 이번 연구에서도 Sato 등(1981)과 Kang 등(1986)의 방법으로 바이러스 분리를 시도한 결과, 분변으로부터 바이러스를 직접 순수 분리하였으며, 단층배양된 조직배양상에서 로타바이러스 특유의 세포변성효과를 관찰할 수 있었다. 또한, 전자현미경으로 조직배양액을 검사하였을 때 로타바이러스 입자를 확인할 수 있었다. 현재까지 국내에서 G9 유전자형 돼지로타바이러스의 감염을 확인하여 보고된 적은 있으나(Kim 등, 2010) 매우 제한적이다. 이번 연구에서 분리된 돼지로타바이러스는 돼지에서 백신개발 및 혈청학적 검사에 유용하게 활용될 것으로 생각한다.

이 연구에서 분리된 PoRV-1 strain은 G9 유전자형으로 확인되었다. G9 유전자형 로타바이러스는 임상적으로 중요한 G 유전자형(G1-4 그리고 G9)의 하나로 전 세계적으로 지속적인 특별한 관심을 끌고 있다. G 유전자형 로타바이러스는 1983년(Clark 등, 1987; Nakagomi 등, 1990)에 미국과 일본에서 처음으로 보고된 후 10여 년간 발생이 없다가 1990년대 중반에 다시 보고되었다(Clark 등, 2004). 1980년대에 분리된 G9 유전자형 로타바이러스는 P[8]과 조합을 이루며 “long” electropherotype과 subgroup II 특이성을 가졌지만, 다시 나타난 G9 유전자형 로타바이러스는 subgroup I 또는 II 특이성을 가지며 P[4], P[6], P[8], P[9], P[11], 또는 P[19]과 조합을 이루고 각각은 “short” 또는 “long” electropherotype을 가지고 있어 유전학적 및 분자생물학적으로 차이가 있다고 보고하였다(Hoshino 등, 2005).

이 연구에서 분리된 PoRV-1 strain의 VP4의 유전자형을 확인하기 위해 이미 P 유전자형이 확인된 reference strain과의 계통학적 분석을 수행한 결과, P[23] 유전자형로 확인된 34461-4, A34, NMTL, PRG921 그리고 PRG942와 같은 cluster에 포함되어 PoRV-1도 P[23] 유전자형일 것으로 추정된다. 돼지로타바이러스에서 P[23] 유전자형은 스페인, 태국, 일본 그리고 국내에서도 보고되었다(Kim 등, 2010; Liprandi 등, 2003; Okitsu 등, 2011; Teodoroff 등, 2005). 돼지에서 P[23] 유전자형은 P[6]과 P[7] 유전자형보다 발생빈도가 낮은 것으로 알려져 왔다. 국내에서도 Kim 등(2010)은 9개의 G9 유전자형 돼지로타바이러스 중 2

개만이 P[23] 유전자형과 조합을 이루고 나머지 7개는 P[7] 유전자형과 조합을 이루어 P[23] 유전자형의 발생빈도가 낮은 것으로 보고하였다. 하지만 Okitsu 등(2011)은 태국에서 2006년부터 2008년 사이에 분리된 돼지로타바이러스의 P 유전자형을 분석한 연구에서 P[23] 유전자형이 대부분을 차지하였다고 보고하였다. Jain 등(2001)은 G9 유전자형 사람로타바이러스는 주로 P[8]과 조합을 이루지만 이외에도 P[6], P[11], P[4], 그리고 P[19]와도 조합하여 유전자형이 다양함을 보고하였다.

Group A 로타바이러스는 VP6의 항원성에 따라 subgroup (subgroup I, II, I+II, non-I/II)으로 구분되었으나 최근에는 VP6 유전자의 염기서열 차이에 따라 16개의 I 유전자형으로 구분하고 있다(Matthijnssens 등, 2008). 분리된 PoRV-1은 G5 유전자형에 속하는 돼지로타바이러스 OSU (subgroup I)와 G11 유전자형인 돼지로타바이러스 YM (subgroup I)과 함께 I5 유전자형에 속하였으나 G4 유전자형 돼지로타바이러스 Gottfried (subgroup II)와는 다른 I 유전자형에 속하였다.

사람과 동물에서 분리되는 로타바이러스의 NSP4 유전자는 염기서열 상동성에 따라 A, B, C 그리고 D 유전자그룹이 존재한다고 보고되었으며(Kirkwood와 Palombo, 1997), 최근에는 Matthijnssens 등(2008)이 NSP4 유전자의 염기서열 차이에 따라 14개의 E 유전자형으로 분류하였다. 이번 연구에서 분리한 PoRV-1 strain의 NSP4 유전자 계통수를 분석한 결과, 모두 E1 유전자형으로 확인되었다. 같은 유전자형(E1) 내의 로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열 상동성을 확인한 결과, 같은 G9 유전자형인 A34, NMTL PRG9121, PRG921 그리고 PRG942와 90.5~94.5%, G1 유전자형인 Wa와 G5 유전자형인 OSU와는 93.7%와 91.2%로 높은 상동성을 보여 NSP4 유전자그룹이 G 유전자형과는 상관성이 없는 것으로 나타났다. 또한, B 유전자그룹으로 분류되었던 OSU와 Wa (Lee 등, 2007)도 PoRV-1 strain과 같은 E1 유전자형으로 분류되어 Kirkwood와 Palombo (1997)의 NSP4 유전자 분류체계와 Matthijnssens 등(2008)에 의한 분류체계가 서로 상관성이 있음을 확인할 수 있었다.

이 연구에서 분리된 G9 유전자형 돼지로타바이러스의 수가 많지 않아 국내에서 유행하는 G9 유전자형의 분자유전학적인 예로서 설명하기에는 부족함이 있다. 이전에는 G9 유전자형이 비정형적인 유전자형이었으나 점차 발병률이 높아지는 것으로 보고되고 있는 것을 고려할 때, G9 유전자형 로타바이러스를

MA104 세포를 통하여 처음으로 순수분리하고 이들 바이러스의 중요 유전자(VP4, VP6, VP7, NSP4)에 대한 분자생물학적인 특성 연구는 국내 발생 경향이나 향후 분리되는 strain에 대한 분자적 그리고 임상적인 기초 자료로서 의의가 있는 것으로 생각한다. 앞으로 국내 G9 유전자형의 돼지로타바이러스에 대한 지속적인 감시를 통하여 더 많은 수의 G9 유전자형 돼지로타바이러스를 확보하여 이에 대한 분자생물학적 특성규명연구가 수행되어야 할 것이다.

결론

최근 국내 양돈장에서 설사를 주 증상으로 하는 장염에 감염된 자돈에서 G9 유전자형 돼지로타바이러스가 분리되었다. 이번 연구에서는 조직배양법을 이용하여 설사분변으로부터 돼지로타바이러스 1주를 세포배양을 이용하여 순수 분리하였으며, 분리된 바이러스(PoRV-1)의 VP7, VP4, VP6 그리고 NSP4 유전자의 염기서열을 확인하여 유전자형이 각각 G9, P[23], I5 그리고 E1임을 확인하였다. 이번 연구에서 분리된 돼지로타바이러스와 확인된 염기서열 결과는 앞으로 G9 유전자형 돼지로타바이러스 백신개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Bellinzoni RB, Mattion NM, Matson DO, Blackhall J, La Torre JL, Scodeller EA, Urasawa S, Taniguchi K, Estes MK. 1990. Porcine rotaviruses antigenically related to human rotavirus serotypes 1 and 2. *J Clin Microbiol* 28: 633-636.
- Chen DY, Estes MK, Ramig RF. 1992. Specific interactions between rotavirus outer capsid proteins VP4 and VP7 determine expression of a cross-reactive, neutralizing VP4-specific epitope. *J Virol* 66: 432-439.
- Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol* 25: 1757-1762.

- Clark HF, Lawley DA, Schaffer A, Patacsil JM, Marcello AE, Glass RI, Jain V, Gentsch J. 2004. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995-1996 season. *J Clin Microbiol* 42: 1434-1438.
- Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. 2010. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol* 155: 1247-1259.
- Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430: 1053-1058.
- Estes MK, Palmer E, Obijeski JF. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol* 105: 123-184.
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449.
- Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. pp. 1917-1974. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM, Martin MA, Roizman B(ed.). *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Ross J, Santos N, Gentsch JR, Kapikian AZ, Hesse RA. 2005. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strain. *Virology* 332: 177-188.
- Huang JA, Nagesha HS, Holmes IH. 1993. Comparative sequence analysis of VP4s from five Australian porcine rotaviruses: implication of an apparent new P type. *Virology* 196: 319-327.
- Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR, Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. 2001. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol* 39: 3524-3529.
- Kang SY, Nagaraja KV, Newman JA. 1986. Primary isolation and identification of avian rotaviruses from turkeys exhibiting signs of clinical enteritis in a continuous MA104 cell line. *Avian Dis* 30: 494-499.
- Kim HJ, Park SI, Ha TPM, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Kang MI, Cho KO, Park SJ. 2010. Detection and genotyping of Korean porcine rotaviruses. *Vet Microbiol* 144: 274-286.
- Kirkwood CD, Palombo EA. 1997. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* 236: 258-265.
- Lee KB, Kim JW, Lee SW, Cheon DS, Jee YM, Kang SY. 2007. Isolation and characterization of G9 human rotaviruses. *J Bacteriol Virol* 37: 231-240.
- Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, López JA, Pujol FH, Ludert JF, Joelsson DB, Ciarlet M. 2003. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 315: 373-380.
- Martella V, Pratelli A, Greco G, Tempesta M, Ferrari M, Losio MN, Buonavoglia C. 2001. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 129-132.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153: 1621-1629.
- Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, Prasad BV, Taniguchi K, Dormitzer PR. 2006. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol* 80: 1513-1523.
- Nakagomi T, Ohshima A, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N, Nakagomi O. 1990. Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain. *Microbiol Immunol* 34: 77-82.
- Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Maneekarn N, Mizuguchi M, Ushijima H. 2011. Predominance of porcine P[23] genotype rotaviruses in piglets with diarrhea in northern Thailand. *J Clin Microbiol* 49: 442-445.
- Pongsuwanna Y, Taniguchi K, Chiwakul M, Urasawa T, Wakasugi F, Jayavasu C, Urasawa S. 1996. Serological and genomic characterization of porcine rotavirus in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J Clin Microbiol* 34: 1050-1057.
- Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 199: 269-275.
- Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J, Saif LJ. 1994. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J Clin Microbiol* 32: 311-317.
- Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R, Matumoto M. 1981. Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* 69: 155-160.
- Shaw RD, Groene WS, Mackow ER, Merchant AA, Cheng EH. 1992. Recombinant baculovirus-expressed rotavirus protein (VP4) in an ELISPOT assay of antibody secretion. *Viral Immunol* 5: 51-59.
- Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. 2001. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol* 75: 1540-1546.
- Teodoroff TA, Tsunemitsu H, Okamoto K, Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Nakagomi T, Nakagomi O. 2005. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J Clin Microbiol* 43: 1377-1384.
- Yolken R, Arango-Jaramillo S, Eiden J, Vonderfecht S. 1988. Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *J Infect Dis* 158: 1120-1123.