

< Original Article >

충남지역 돼지유행성설사 바이러스 Spike 유전자 염기서열 및 계통분석

박효선* · 육심용 · 전동민 · 이진주 · 신창호

충청남도가축위생연구소 역학조사과

Genetic sequence and phylogenetic analysis of spike genes of Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Chung-Nam area

Hyo-Seon Park*, Sim-Yong Yook, Dong-Min Jeon, Jin-Ju Lee, Chang-Ho Shin

Veterinary Epidemiology Division, Chungnam Veterinary Research Institute, Hongsung 32280, Korea

(Received 13 December 2016; revised 26 December 2016; accepted 26 December 2016)

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) causes an acute and lethal watery diarrhea in piglets that is great economic losses to the swine country worldwide. The spike (S) glycoprotein is an important determinant for PEDV biological properties. In the present study, we determined the full-length S gene sequences of five Chung-nam PEDV field isolates collected in 2016. The S gene was amplified by RT-PCR, purified, sequenced, analyzed and then compared with published sequences of other PEDV strains. 5 field strains share 98.5%~99.9% homologies with each other at the nucleotide sequence level and 96.7%~99.9% homologies with each other at the amino acids sequence level. Most field strains have nucleotide insertions, deletions and mutation regions, and show lower homologies (93.1~93.8%) with classical and vaccine strains, however higher homologies (99.1%~99.5%) with US PEDV isolates in 2013. By phylogenetic tree analysis based on nucleotide sequence, five PEDV field isolates were clustered into Genogroup 2b but differ genetically from the vaccine strains (SM-98 and DR-13).

Key words : PEDV, S gene, PCR, Phylogenetic analysis

서 론

돼지유행성설사(Porcine epidemic diarrhea, PED)는 돼지에서 전염성이 강한 급성의 소화기 질환으로 극심한 장염과 설사, 포유자돈에서 매우 높은 치사율을 일으키는 질병이다(Pijpers 등, 1993; Li 등, 2013). 1971년 영국에서 처음 보고된 이후 유럽과 아시아 전 지역의 양돈국가에서 발병이 보고되다가 2013년 4월 미국에서 폭발적으로 발생한 이후 캐나다와 멕시코까지 전파되었으며 미국에서만 1년 동안 8백만두 이상의 자돈폐사를 가져왔다(Pijpers 등, 1993; Song 등, 2015; Lee 등, 2015). 국내에서는 1992년 첫 발생 이후

2010년까지 매년 꾸준히 발생하여 양돈산업에 심각한 생산성 저하를 가져왔다. 2010~2011년 돼지구제역의 발생으로 PED 발생이 감소하였으나 2013년 11월 재발생한 후 국내 전 지역으로 빠르게 확산되었다(Lee 등, 2014; Kim 등, 2016).

PED의 원인체인 PEDV (Porcine epidemic diarrhea virus)는 Coronaviridae family에 속하는 single-stranded positive-sense RNA 바이러스이며 Genome은 4개의 구조단백질(spike [S], envelope [E], membrane [M], nucleocapsid [N])과 3개의 비구조단백질(replicase 1a, replicase 1b, ORF3)을 encoding한다(Li 등, 2013; Kim 등, 2016). 구조단백질 중 N protein은 viral RNA와 결합되어 있고 숙주의 세포성면역을 유도하는데 중요하다고 알려져 있으며 유전적으로 잘 보존되어 있어

*Corresponding author: Hyo-Seon Park, Tel. +82-41-635-7048, Fax. +82-41-635-7969, E-mail. nopi97@korea.kr

감염초기 진단을 위한 항원으로써 추천되고 있다(Li 등, 2013; Song 등, 2015). S protein은 바이러스 표면에 위치한 당단백질로 숙주세포의 당단백질 수용체와 결합하여 중화항체 생성에 관여한다(Chang 등, 2002; Tian 등, 2013). 다른 Coronavirus들과 유사하게 바이러스의 유전적 다양성과 분자역학에 중요한 역할을 하는 단백질로 PEDV 항원성을 결정하는 것으로 알려져 있다(Chen 등, 2013; Lee 등, 2014; Song 등, 2015; Lee, 2015).

현재 우리나라에서 PED의 예방은 모든에게 백신을 접종하여 모체항체가 자돈으로 이행되는 방법을 선택하고 있다. 그러나 거의 모든 농가에서 백신을 접종함에도 불구하고 매년 꾸준히 발생하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 백신접종에도 불구하고 아직까지 매년 발생하고 있는 PED의 발생 이유를 분석하고자 충남에서 분리된 PEDV를 대상으로 S 유전자의 염기 및 아미노산 서열을 분석하였으며, 기존에 보고된 국내외 분리주 및 백신주 사이의 유전적 특성을 비교분석하였다.

재료 및 방법

시료의 채취 및 RNA 추출

2016년 충남지역에서 PED로 진단된 농가의 시료(CNHS1, CNHS2, CNHS3, CNHS4, CNBR6)를 공시하였다(Table 1). 소장 조직 유제를 PBS에 5% W/V로 만들어 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 채취하였다. 상층액에서 RNA추출은 Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic acid Purification Kit (Promega, USA)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 핵산을 추출하여 실험에 사용하였다.

Table 1. General information on PED outbreak farms

Strain	Breeding scale (pigs)	Vaccine type	Damage situation* (pigs)
CNHS1	3,000	Killed Vaccine	50
CNHS2	7,000	Killed Vaccine	30
CNHS3	3,300	Killed Vaccine	150
CNHS4	3,000	Killed Vaccine	50
CNBR6	4,200	Killed Vaccine	380

*Damage situation: The number of outbreaks of clinical signs (vomiting, watery diarrhea and death) in the sucking piglets.

RT-PCR 검사

PEDV S gene의 증폭에 사용한 primer는 Tian 등 (2013)과 동일하게 합성하였으며 primer의 위치는 Fig. 1에 표시하였다. 합성한 primer로 증폭이 안되는 PEDVS3 region의 일부 시료(CNHS1, CNHS2, CNHS4)는 Genbank의 data (JN599150)를 기초로 primer를 제작하여 사용하였다(Table 2). cDNA의 합성은 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio rad Laboratories, USA)를 이용하였으며, -20°C에 보관 후 PCR에 사용하였다. PCR은 cDNA template 1 µL, 10X LA PCR Buffer 5 µL, 25 mM MgCl₂ 5 µL, 2.5 mM dNTP Mixture 8 µL, 10 pM forward primer 1 µL, 10 pM reverse primer 1 µL, LA Taq DNA Polymerase (TaKaRa, Korea) 0.5 µL에 총 반응용액 50 µL가 되도록 증류수를 첨가한 후 PCR (denaturation 94°C/30 sec, annealing 52°C/30 sec, extension 72°C/90 sec, 35 cycles)을 핵산증폭기(C1000 Touch Thermal cycler, Bio-rad Inc., USA)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 유전자 크기는 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea)를 같이 전기영동 하여 확인하였다.

정제화 및 염기서열의 분석

PEDV의 염기서열을 분석하기 위하여 S gene에서 증폭된 PCR 생성물을 Gel extraction kit를 사용하여 정제하였다. 염기서열 분석과 동일성은 Clustal W연

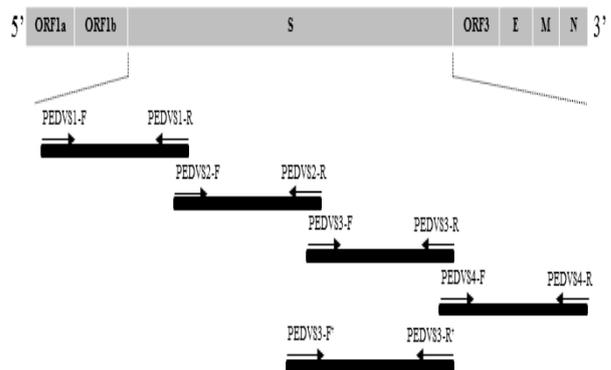


Fig. 1. Schematic representation of the gene coding for the S protein. The positions of the oligonucleotide primers used for PCR amplification are indicated by arrow heads. Four DNA fragments amplified by RT-PCR are sequenced.

Table 2. List of primers utilized in this study

Primers	Nucleotide sequence, 5'→3'	Purpose	Primer Location	Length (bp)*	Samples
PEDVS1-F	CCATTAGTGATGTTGTGTTAG	Sequencing	20,535~20,555	1,031	
PEDVS1-R	GCACAGCAGCTCCATT	Sequencing	21,565~21,550		
PEDVS2-F	CCACATAACCAGAAGGTTTTAG	Sequencing	21,372~21,392	1,146	
PEDVS2-R	CCAGTAATCAACTCACCCCTT	Sequencing	22,517~22,498		
PEDVS3-F	CCCTGAGTTTGGTAGTGG	Sequencing	22,466~22,463	1,154	CNHS3, CNBR6
PEDVS3-R	CATCCGTCTGTAGAGCAAG	Sequencing	23,599~23,581		
PEDVS3-F [†]	TGGTCATAGTGGTGCCAACC	Sequencing	22,163~22,182	1,419	CNHS1, CNHS2, CNHS4
PEDVS3-R [†]	TTGCGCTGTAGAACATCCGT	Sequencing	23,581~23,562		
PEDVS4-F	CTCATCGGTGGTATGGTGCT	Sequencing	23,497~23,516	1,355	
PEDVS4-R	AGCAGACTTTGAGACAICTTTGAC	Sequencing	24,851~24,828		

*Length of PCR products. [†]Designed based on the sequences of GeneBank data (JN599150).

산을 이용하여 다중 정렬하였으며, phylogenetic tree는 MEGA version 6 (Tamura 등, 2013)을 이용하여 neighbor-joining (NJ) method로 1,000회의 bootstrap을 실시하여 계통수를 생성하였으며, 분석된 유전자 서열은 GeneBank에 공개된 자료로 비교하였다(Table 3).

결 과

PEDV S 유전자의 염기서열 및 아미노산 분석

본 연구에서 분리된 5개의 PEDV (CNHS1, CNHS2, CNHS3, CNHS4, CNBR6) S 유전자 염기서열을 분석한 결과 4,161 bp 길이의 염기서열과 1,386개의 아미노산으로 암호화되어 있었다. 염기서열과 아미노산 상동성을 분석한 결과 분리주간 염기서열 상동성은 98.5~99.9%, 아미노산 상동성은 96.7~99.9%을 나타내었으며 가장 높은 상동성을 보이는 주는 IA2 (미국 분리주)로 염기서열 상동성은 99.1~99.5%, 아미노산 상동성은 97.8~99.4%였다. 반면에 국내에서 PEDV 백신주로 사용되는 DR-13, SM-98주와의 염기서열은 93.1~93.7%, 아미노산은 91.2~93.0%의 낮은 일치성을 보였다. 기존 국내에서 분리된 KNU-1305, KNU-1409-1과의 염기서열과 아미노산은 각각 99.0~99.4%, 97.5~99.3%의 높은 상동성을 보였다(Table 4). S 유전자의 N-terminal region을 CV777과 SM-98주를 기준으로 비교분석한 결과 4개의 아미노산 삽입(56~59번 위치), 4개의 결손(115~118번 위치), 1개의 삽입(140번 위치), 2개의 결손(160~161번 위치)이 존재하였다(Fig. 2).

Table 3. The recent Chung-nam porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates and reference strains used in this study

Strain	Country and year	Accession number
GD-A	China, 2012	JX112709
CHGD-01	China, 2011	JN980698
AJ1102	China, 2011	JX188454
LC	China, 2012	JX489155
ZJCZ4	China, 2011	JX524137
IA2	USA, 2013	KF468754
ON-007	Canada, 2014	KM189366
13-019349	USA, 2013	KF267450
IA1	USA, 2013	KF468753
KNU-1305	Korea, 2013	KJ451040
MN	USA, 2013	KF468752
KNU-1409-1	Korea, 2013	KJ741221
CH/ZMDZY/11	China, 2011	KC196276
BJ-2011-1	China, 2011	JN825712
JS-HZ2012	China, 2012	KC210147
GD-B	China, 2012	JX088695
AH2012	China, 2012	KC210145
DR-13/attenuated*	Korea, 2003	JQ023162
CV777	Belgium, 1978	AF353511
SD-M	China, 2012	JX560761
JS2008	China, 2008	KC109141
DR-13	Korea, 1999	JQ023161
CH-S	China, 1986	JN547228
SM-98*	Korea, 1998	GU937797
LZC	China, <2006	EF185992
KNU-0901	Korea, 2010	GU180144
KNU-0801	Korea, 2009	GU180142
Spk1	Korea, 2005	AF500215
TGEV	USA, 2006	DQ811788
CNHS1 [†]	Korea, 2016	This study
CNHS2 [†]	Korea, 2016	This study
CNHS3 [†]	Korea, 2016	This study
CNHS4 [†]	Korea, 2016	This study
CNBR6 [†]	Korea, 2016	This study

*Korean PEDV vaccine strains. [†]Chung-nam PEDV isolates sequenced in this study.

Table 4. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of PEDV reference strains and PEDV outbreak in Chungnam

Virus strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1. CNHS1/Korea/2016	99.7	98.8	99.7	98.5	97.2	97.1	97.2	96.8	98.5	98.5	98.9	98.5	98.4	99.0	99.1	99.0	98.5	99.0	99.0	99.0	99.1	97.8	93.1	93.4	94.3	93.3	93.5	92.9	93.2	93.1	
2. CNHS2/Korea/2016	99.2	99.0	99.9	98.8	97.4	97.3	97.5	97.1	98.7	98.7	99.1	98.7	98.7	99.2	99.3	99.2	98.8	99.2	99.2	99.2	99.3	98.0	93.4	93.7	94.5	93.5	93.7	93.1	93.4	93.3	
3. CNHS3/Korea/2016	97.3	98.0	99.0	99.0	97.7	97.6	97.8	97.4	99.0	99.0	99.4	98.9	98.9	99.5	99.5	99.5	99.0	99.4	99.4	99.4	99.5	98.3	93.6	93.8	94.7	93.7	93.9	93.2	93.6	93.4	
4. CNHS4/Korea/2016	99.3	99.9	98.1	98.7	97.4	97.3	97.5	97.0	98.7	98.7	99.1	98.7	98.7	99.2	99.3	99.2	98.8	99.2	99.2	99.2	99.3	98.0	93.3	93.6	94.5	93.4	93.7	93.1	93.4	93.3	
5. CNBR6/Korea/2016	96.7	97.3	98.2	97.3	97.4	97.4	97.5	97.1	98.7	98.7	99.1	98.6	98.7	99.2	99.3	99.2	98.7	99.2	99.2	99.2	99.3	98.0	93.3	93.6	94.5	93.4	93.7	93.1	93.3	93.3	
6. AJ1102/China/2011	96.4	97.0	98.3	97.1	97.3	99.2	100.0	99.0	98.2	97.8	98.0	97.9	98.0	98.1	98.0	98.1	98.2	97.9	97.9	98.0	98.0	98.9	93.6	94.1	94.8	93.7	94.0	93.6	93.7	93.8	
7. GD-A/China/2012	96.2	96.8	98.0	96.9	97.1	99.3	99.2	99.6	98.1	97.7	97.9	97.8	98.0	98.0	97.9	98.0	98.1	97.8	97.9	98.0	98.8	93.5	93.9	94.8	93.7	93.9	93.4	93.6	93.7	93.8	
8. LC/China/2012	96.4	97.0	98.3	97.1	97.3	100.0	99.3	99.0	98.3	97.9	98.0	98.0	98.1	98.1	98.1	98.1	98.2	97.9	98.0	98.1	98.9	93.6	94.1	94.8	93.7	94.0	93.6	93.7	93.8		
9. CHGD-01/China/2011	95.9	96.5	97.7	96.5	96.7	99.0	99.2	99.0	97.9	97.5	97.6	97.5	97.7	97.7	97.7	97.7	97.9	97.9	97.6	97.7	97.7	98.5	93.3	93.8	94.7	93.6	93.8	93.3	93.5	93.5	
10. BJ-2011-1/China/2011	97.4	98.1	99.1	98.1	98.2	98.8	98.5	98.8	98.1	99.2	99.3	99.5	99.7	99.4	99.3	99.4	99.9	99.2	99.3	99.3	99.3	98.7	94.0	94.4	95.2	94.1	94.4	93.9	94.0	94.1	
11. CH/ZMDZY/11/China/2011	96.8	97.5	98.5	97.5	97.7	98.0	97.8	98.0	97.5	99.1	99.3	98.9	99.1	99.4	99.3	99.4	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.3	98.4	93.7	94.0	94.9	93.8	94.0	93.5	93.7	93.6
12. 13-019349/USA/2013	97.4	98.1	99.1	98.1	98.2	98.3	98.1	98.3	97.7	99.3	98.7	99.0	99.2	99.9	99.7	99.9	99.3	99.6	99.6	99.7	98.5	93.7	94.0	94.9	93.8	94.0	93.5	93.7	93.6		
13. AH2012/China/2012	97.4	98.1	98.9	98.1	98.0	98.1	97.9	98.1	97.5	99.1	98.6	99.0	99.4	99.1	99.2	99.1	99.5	99.1	99.1	99.2	98.5	93.9	94.2	95.0	94.0	94.3	93.6	93.9	93.8		
14. GD-B/China/2012	97.3	98.0	98.8	98.1	98.2	98.5	98.3	98.5	97.9	99.6	98.9	99.1	99.1	99.3	99.2	99.3	99.8	99.1	99.2	99.2	99.2	98.6	93.9	94.2	95.1	94.0	94.3	93.7	93.9	93.8	
15. IAI/USA/2013	97.8	98.4	99.4	98.5	98.5	98.6	98.4	98.6	98.0	99.6	99.1	99.6	99.4	99.4	99.8	100.0	99.4	99.7	99.7	99.8	98.6	93.8	94.1	95.0	93.9	94.1	93.6	93.8	93.7		
16. IA2/USA/2013	97.8	98.4	99.4	98.5	98.4	98.6	98.3	98.6	98.0	99.6	99.0	99.6	99.3	99.4	99.9	99.8	99.4	99.8	99.8	99.8	99.9	98.6	93.8	94.1	95.0	93.9	94.2	93.5	93.8	93.7	
17. ON-007/Canada/2014	97.7	98.3	99.4	98.4	98.4	98.6	98.3	98.6	98.0	99.6	99.0	99.6	99.3	99.4	99.9	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	98.6	93.8	94.1	95.0	93.9	94.1	93.6	93.8	93.7	
18. JS-HZ2012/China/2012	97.5	98.2	99.2	98.3	98.3	98.8	98.6	98.8	98.3	99.9	99.1	99.4	99.3	99.6	99.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.8	98.4	93.7	94.0	94.9	93.8	94.0	93.5	93.7	93.7	
19. KNU-1305/Korea/2013	97.5	98.2	99.2	98.3	98.3	98.3	98.0	98.3	97.8	99.3	98.7	99.3	99.0	99.1	99.6	99.6	99.4	99.7	99.8	98.4	93.7	94.0	94.4	95.2	94.2	94.4	93.8	94.1	94.0		
20. KNU-1409-1/Korea/2013	97.6	98.3	99.3	98.3	98.3	98.5	98.3	98.5	98.0	99.5	98.9	99.5	99.2	99.3	99.9	99.8	99.6	99.6	99.7	99.8	98.5	93.8	94.0	94.9	93.8	94.1	93.5	93.8	93.7		
21. MN/USA/2013	97.6	98.3	99.3	98.3	98.4	98.5	98.3	98.5	97.9	99.5	98.9	99.6	99.2	99.3	99.9	99.8	99.6	99.5	99.7	99.8	98.6	93.8	94.1	95.0	93.9	94.2	93.6	93.9	93.7		
22. ZICZ4/China/2011	96.9	97.5	98.7	97.6	97.6	99.1	98.7	99.1	98.3	98.9	98.3	98.6	98.8	99.0	98.9	98.9	99.1	98.6	98.8	98.8	98.6	93.8	94.3	93.8	96.3	97.4	96.5	96.6	95.8	96.5	96.0
23. CH_S/China/1986	91.9	92.5	93.4	92.6	92.5	93.5	93.2	93.5	92.9	93.5	93.1	93.1	93.3	93.3	93.5	93.4	93.4	93.6	93.1	93.3	93.4	93.8	93.9	94.3	95.1	94.0	94.3	93.8	94.0	93.9	
24. CV777/1978/belgium	92.0	92.6	93.4	92.7	92.9	93.6	93.5	93.6	93.5	93.8	93.4	93.4	93.6	93.6	93.8	93.7	93.7	93.8	93.6	93.8	93.7	93.6	96.2	98.5	96.8	96.9	99.4	96.7	99.6		
25. DR-13/Korea/1999	92.8	93.4	94.3	93.5	93.7	94.6	94.4	94.6	94.4	94.6	94.2	94.3	94.4	94.7	94.6	94.6	94.8	94.5	94.7	94.6	94.6	97.0	98.0	98.2	98.2	97.9	98.2	98.1			
26. Attenuated_DR-13/Korea/2003	91.4	92.1	93.0	92.2	92.2	93.0	92.9	93.0	92.8	93.3	92.8	93.0	93.0	93.0	93.3	93.3	93.3	93.4	93.0	93.3	93.3	93.1	96.0	96.1	98.0	99.6	96.3	99.8	96.5		
27. JS2008/China/2008	91.7	92.3	93.3	92.4	92.5	93.4	93.0	93.4	93.0	93.5	93.0	93.2	93.2	93.3	93.6	93.5	93.5	93.6	93.3	93.5	93.5	93.6	96.2	96.0	97.8	99.3	96.3	99.6	96.6		
28. LZC/China/2006	91.0	91.7	92.5	91.7	92.0	92.7	92.5	92.9	92.5	92.5	92.6	92.7	92.8	92.8	92.8	92.8	92.9	92.6	92.8	92.8	92.8	92.7	95.2	99.1	97.0	95.1	95.1	96.2	99.1		
29. SD-M/China/2012	91.1	91.7	92.7	91.8	91.9	92.9	92.6	92.9	92.5	92.6	92.6	92.7	93.0	92.9	92.9	93.0	92.9	92.9	92.9	92.9	92.9	92.9	93.0	95.8	95.7	97.6	99.5	99.1	94.8	96.4	
30. SM-98/Korea/1998	91.2	91.8	92.6	91.9	92.1	93.0	92.8	93.1	92.6	92.6	92.8	92.9	93.0	92.9	92.9	93.1	92.8	93.0	92.9	92.9	92.9	92.9	95.3	99.1	97.1	95.3	95.3	98.2	95.0		

The percent identity was shown in the upper right (nucleotide) and lower left (deduced amino acid).

#CV777/1978/belgium	MRSLIYFWLL LPVLPTLSLP QDVTRCQSTT NFRFFSKFN VQAPAVVVLG GYLPS---	M NSSSWYCGTG IETASGVHGI	[76]
#SM98/Korea/1998	[76]
#IA2/USA/2013	.K..T...F...S.....SAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#KNU-1409-1/Korea/2013	...T...F...S.....SAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CNHS1/Korea/2016	.K..T...F...S.....AAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CNHS2/Korea/2016	.K..T...F...S.....AAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CNHS3/Korea/2016	.K..T...F...S.G.....SAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CNHS4/Korea/2016	.K..T...F...S.....AAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CNBR6/Korea/2016	.K..T...F...S.....A.SAN.....IGENC VN.T...AGQ HP.....	[80]
#CV777/1978/belgium	FLSYIDSGQG FEIGISQEPF DPSGYQLYLH KATN---GN TNAIARLRIC	QFPDNKTLGP TVR---IVTTGR NCLFNKAIPA	[151]
#SM98/Korea/1998S.....ESQN.....	[155]
#IA2/USA/2013	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....	[156]
#KNU-1409-1/Korea/2013	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....	[156]
#CNHS1/Korea/2016	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....V..	[156]
#CNHS2/Korea/2016	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....	[156]
#CNHS3/Korea/2016	.I.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....	[156]
#CNHS4/Korea/2016	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....V..	[156]
#CNBR6/Korea/2016	.V.H.RG.H.....T.....SI.....AN.....D...	[156]
#CV777/1978/belgium	YMRDGKDIVV GITWDNDRVT VFADKIYHFY LKNDWSRVAT RCYNRRSCAM	QVYVTPYYM LNVTISAGEDG IYYEPTANC	[231]
#SM98/Korea/1998	[235]
#IA2/USA/2013	H.S---LHS.....S...Y..F.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#KNU-1409-1/Korea/2013	H.S---LHS.....S...Y..F.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#CNHS1/Korea/2016	H.S---LHS.....S...Y..F.SN.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#CNHS2/Korea/2016	H.S---LHS.....S...Y..F.SN.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#CNHS3/Korea/2016	H.S---LHS.....S...Y..F.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#CNHS4/Korea/2016	H.S---LHS.....S...Y..F.SN.....K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]
#CNBR6/Korea/2016	H.S---LHS.....L...S.....F.....S K...SGG.....E.....S.Q.....	[234]

Fig. 2. Alignment of amino N-terminal 1-234 amino acid of S proteins between the reference strains and 5 Chung-nam strains. The dashes(-) indicate the deleted sequences. Insertion and deletions within PEDV isolates are indicated by boxes (Red box indicate the inserted amino acids compared with CV777 and SM-98. Blue box indicate the deleted amino acids compared with CV777 or SM-98).

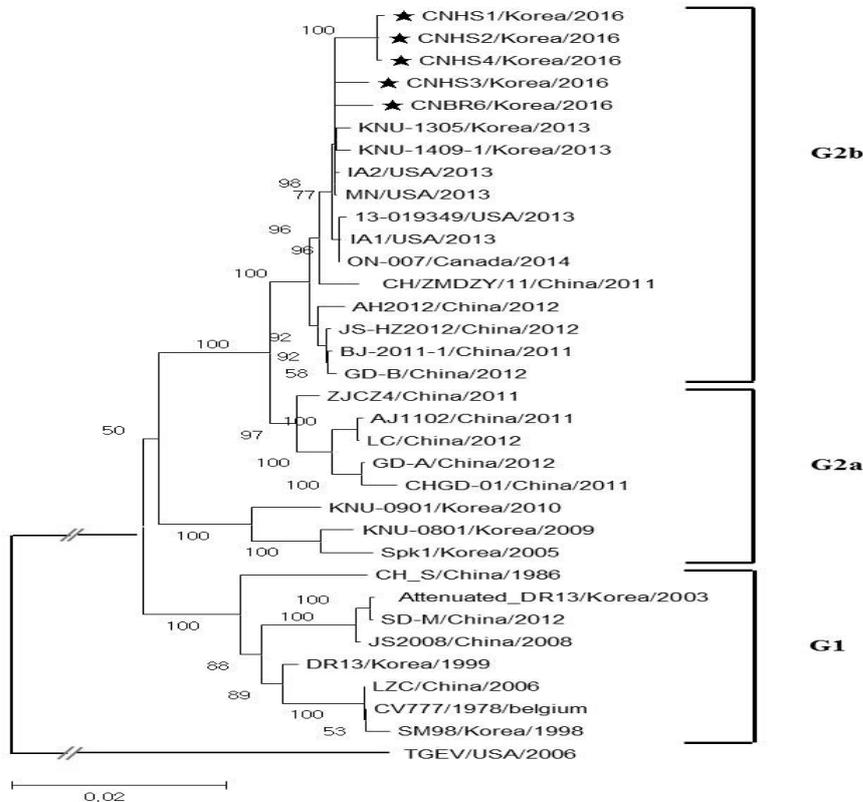


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence corresponding to the full-length S gene of PEDV strains. Putative similar regions of S gene of other distantly related coronavirus, transmissible gastroenteritis virus (TGEV), was also included in this study. Sequencing alignments were performed using the Clustal W program, and the phylogenetic tree was constructed from the aligned nucleotide sequences by using the neighbor-joining method. The bootstrap values were determined from 1,000 replicates of original data. The scale bars indicate the number of 0.02 inferred substitutions per site.

Phylogenetic tree 분석

PEDV S 유전자의 염기서열을 이용하여 국내외 분리주와 phylogenetic tree를 분석한 결과 본 연구에서 분리된 5주 모두 genogroup 2b (G2b) 계열에 속하였다. G2는 2개의 subgroup (G2a, G2b)으로 구성되는데 G2b에는 최근에 유행하는 국내 분리주(KNU-1305/2013, KNU-1409-1/2013)와 미국 분리주(IA2/2013, MN/2013, 13-019349/2013, IA1/2013), 캐나다 분리주(ON-007/2014) 및 중국 분리주(CH/ZMDZY/1/2011, AH-2012/2012, JS-HZ2012/2012, BJ-2011-1/2011, GD-B/2012)가 속하였다. 한편 국내 백신주로 사용되고 있는 DR-13과 SM-98주는 G1 계열로 현재 유행하고 있는 PEDV와는 계통발생학적으로 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3).

S 유전자의 항원성 분석

S 유전자의 항원성에 대한 변이를 조사하고자 neutralizing epitope로 밝혀진 COE (503~642 aa), SS2 (752~758 aa), SS6 (768~775 aa), 2C10 (1,372~1,378 aa) 부위를 백신주인 SM-98주와 비교분석하였다. COE domain에서, 분리된 5주 모두 변이된 부위는 10개 (L→S at 507, A→S at 521, L→H, R at 525, S→G at 527, V→I at 531, T→S at 553, G→S at 598, A→E, D at 609, L→F at 616, I→V at 639)였으며 3주(CNHS1, CNHS2, CNHS4)만 변이된 부위는 3개(D→N at 546, T→N at 576, G→V at 613), 1주(CNBR6, CNHS3)만 변이된 부위는 각각 1개(L→Q at 505), 2개(T→I at 536, K→N at 567)였다. SS6 region에서는 분리된 5주 모두 2개(P→S at 767, Y→S at 769)부위에서 아미노산 변이가 관찰되었으며 SS2와 2C10 region에는 어떠한 변이도 관찰되지 않았다(Fig. 4).

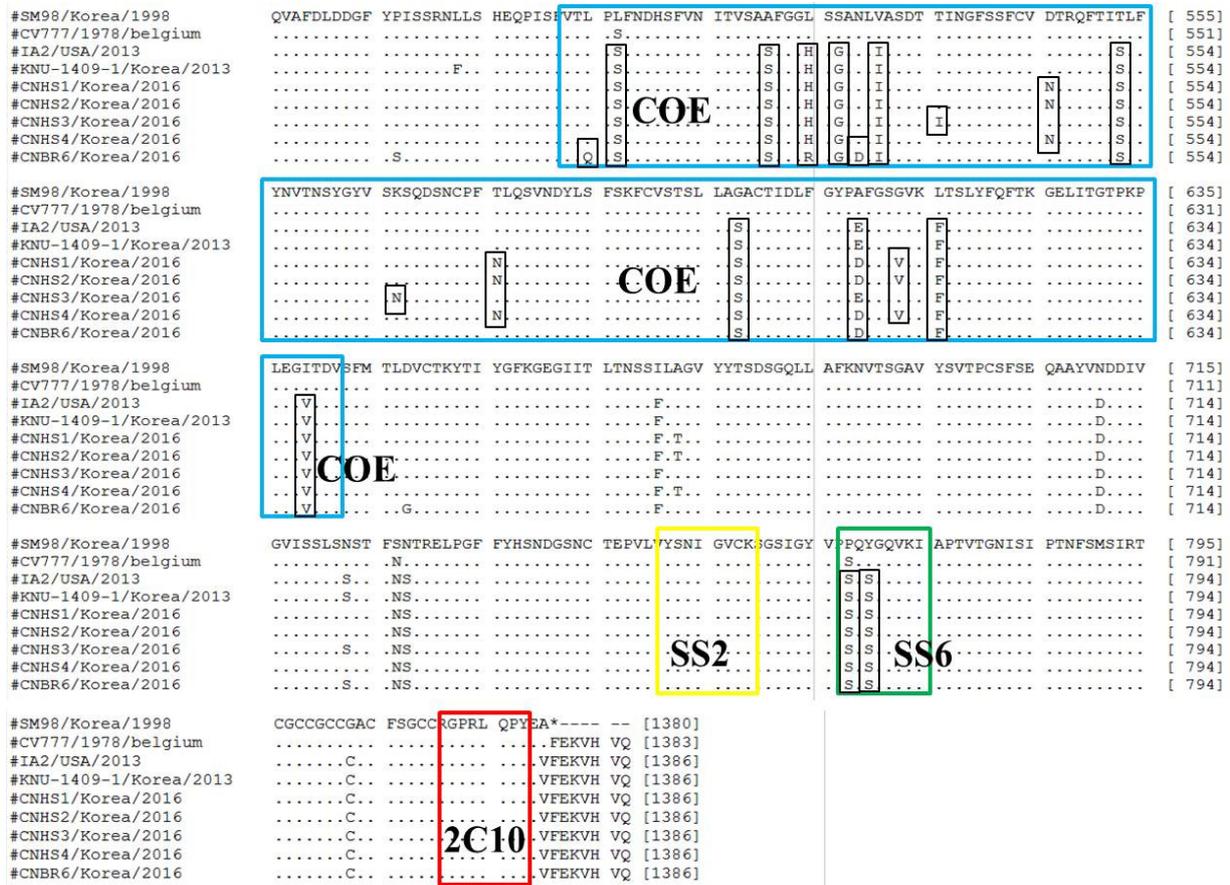


Fig. 4. Comparison of the antigen epitopes of field strains and reference strains. Dots indicate the amino acids are identical to those of reference strain SM-98. COE is in the blue box, SS2 is in the yellow box, SS6 is in the green box and the against 2C10 is in the red box.

고 찰

매년 반복적으로 발생하는 PED는 2014년 한해만 169건이 보고되는 등 국내 양돈산업에 상당한 경제적 피해를 가져왔다. Park 등(2009)은 2007년 159개 농장의 30~150일령 돼지를 대상으로 항체수준을 파악한 실험에서 91.8%가 양성으로, 농장의 대다수에서 PED 감염이 있음을 보고하였다.

2000년 초부터 국내분리주인 SM98-1과 DR-13주를 바탕으로 만들어진 약독화백신과 사독백신이 개발된 이후 과거에 비해 발생이 감소하였으나 백신접종농장에서 PED의 지속적인 발생은 국내시판백신의 효능에 대한 논란까지 불러왔다. 이 시기에 유행했던 야외분리주의 S 유전자를 분석한 결과 G2a 그룹으로, G1a 그룹에 속해 있는 CV777주나 국내 백신주와는 차이가 있었으며 이 후 폭발적으로 발생했던 2013~2014년에는 G2b 그룹으로 미국 분리주와 상당히 밀접해 있음이 보고되었다(Lee와 Lee, 2014; Lee 등, 2015). 본 연구에서 분리된 5주의 S 유전자의 염기서열도 G2b 계열로 백신주인 SM-98 및 DR-13주와는 다른 그룹을 형성하고 있으며 2013년에 발생했던 IA2, MN, 13-019349주 등 미국 분리주와 가장 유사함을 보여 앞서 보고된 결과와 일치함을 알 수 있었다.

PEDV S protein은 표면에 위치한 유일한 표면단백질로 중화항체 생성에 관여하며 유전자의 변이에 따라 PED의 병원성 및 백신개발에 영향을 미칠 수 있기 때문에 S 유전자의 genotype은 매우 중요하다고 알려져 있다(Song 등, 2015). 이번 충남지역에서 분리한 5주의 염기서열 및 아미노산서열을 분석한 결과 1,386개의 아미노산을 암호화하는 4,161개의 염기로 구성되어 있었으며 CV777과 비교해서는 9개의 염기(3개의 아미노산), SM98과는 18개의 염기(6개의 아미노산)가 더 길었다. S 유전자 중 가장 변이가 심하다고 알려져 있는 N-terminal 부분에서 CV777과는 아미노산 삽입 2부위(4-aa, 1-aa) 및 결손 1부위(2-aa), SM-98과는 아미노산 삽입 2부위(4-aa, 1-aa) 및 결손 2부위(4-aa, 2-aa)가 관찰되었다. 이는 Lee 등(2010)에서 보고한 G2 그룹의 뚜렷한 유전적 특징과도 일치한다.

Sun 등(2011)의 연구에서는 중화항체생성에 관여하는 COE domain의 경우 CV777과 비교하여 분리주에서 아미노산 변이 중 3개가 S protein의 소수성에 영향을 미친다고 보고하였는데 본 연구에서도 3개의 부위를 포함하여 11~12개의 아미노산 변이가 관찰

되었다. S 유전자에서 염기서열의 삽입·결손 및 항원부위에서의 변이는 지금보다 병원성이 높은 변종 PED 바이러스의 발생이 있을 수 있음을 시사한다.

지속적으로 PED 백신을 접종함에도 불구하고 질병의 발생이 감소되지 않는 이유로 현재까지 많은 연구자들이 야외주와 백신주간의 유전자적 차이로 인해 방어력이 저하되는 것으로 추정하고 있다. 이에 국내 유행하는 야외주를 이용한 백신 개발의 필요성이 요구되고 있지만 Chen 등(2014)의 연구에 따르면 바이러스 특성상 세포배양을 통한 계대 시 감염력이 소실되어 바이러스 분리가 어렵다고 보고되고 있어 바이러스 특성 규명을 위한 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

유전자 염기서열 분석을 통해 충남지역에서 분리된 PEDV가 최근 국내에서 유행하는 같은 계열의 바이러스임이 확인되었으나 RNA 바이러스 특성상 변이가 매우 빠르게 이루어질 것이며, 국내 백신주로 사용되는 SM-98과 DR-13주와의 염기서열 및 아미노산서열을 비교하였을 때 각각 5.3~6.9% 및 5.7~8.8%의 많은 차이가 있음을 볼 때 앞으로도 국내에 유행하는 PEDV 변이주에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

설사증상을 보이는 자돈으로부터 PED를 확인하였으며 확인된 시료로부터 PED S gene을 증폭한 후 유전적 특성을 비교분석하였다. S gene의 염기서열은 분리주간 98.5~99.9%, 아미노산은 96.7~99.9%의 일치성을 보였으며, 미국 분리주인 IA2와 가장 높은 상동성을 보였다. 그러나 백신주로 사용되는 SM-98 및 DR-13주와는 93.1~93.7% (91.2~93.0%)로 낮은 일치성을 보였다. Phylogenetic tree 분석에서는 기존에 국내에서 분리된 주와 같은 G2b 그룹에 속하는 것으로 확인되었다. 중화항체 유도부위로 알려진 COE (499~638aa), SS2 (748~755aa), SS6 (764~771aa), 2C10 (1,368~1,374aa)에서는 백신주인 SM-98과 비교해서 14~15개의 아미노산 변이가 나타났다. 본 연구에서 분리된 PEDV의 아미노산 변이가 항원성 변화를 유발하는지에 대해서는 좀 더 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. 2002. Identification of the Epitope Region Capable of Inducing Neutralizing Antibodies against the Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Mol Cells*, Vol. 14, No.2; 295-299.
- Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, Li C, Chi Y, Feng L. 2013. Detection and Molecular Diversity of Spike Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in China. *Viruses* 5: 2601-2613.
- Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Phillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J. 2014. Isolation and Characterization of Porcine Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the United States. *J Clin Microbiol*. 52: 234-243.
- Kim KJ, Park YK, Bokyung Park BK, Lam TQ, Park SY, Kim JH, Hahn TW. 2016. Genetic diversity of nucleocapsid genes of recent porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Korean J Vet Res* 56: 23-28.
- Lee CH. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Lee Virology Journal* 12: 193.
- Lee DK, Park CK, Kim SH, Lee C. 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res*. 149: 175-82.
- Lee SH, Ko DH, Kwak SK, Lim CH, Moon SU, Lee DS, Lee CH. 2014. Reemergence of Porcine epidemic diarrhea virus on Jeju Island. *Korean J Vet Res* 54:185-188.
- Lee SH, Lee CH. 2014. Outbreak-Related Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains Similar to US Strains, South Korea, 2013. *Emerg.Infect.Dis.* 20: 1223-1226.
- Li Z, Chen F, Yuan Y, Zeng X, Wei Z, Zhu L, Sun B, Xie Q, Cao Y, Xue C, Ma J, Bee Y. 2013. Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China. *Arch Virol* 158: 1267-1273.
- Park CK, Pak SI. 2009. Infection patterns of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) by sera-epidemiological analysis in Korean pig farms. *J Life Sci.* 19: 1304-8.
- Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C, Verheijden JH. 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Ver Rec* 132: 129-131.
- Song DS, Moon HJ, Kang BK. 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 4: 166-176.
- Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. 2011. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg.Infect.Dis.* 18: 161-163.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol.Bio.Evol.* 30: 2725-2729.
- Tian Y, Yu Z, Cheng K, Liu Y, Huang J, Xin Y, Li Y, Fan S, Wang T, Huang G, Feng N, Yang Z, Yang S, Gao Y, Xia X. 2013. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of New Variants of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Gansu, China in 2012. *Viruses* 5: 1991-2004.