

<원 저>

최근 국내에서 유행하는 돼지 유행성 설사 바이러스 nucleocapsid 유전자의 다양성 및 계통 분석

김기주¹ · 박유경¹ · 박보경¹ · 람쯔광¹ · 박소연¹ · 김재훈² · 한태욱^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, ²제주대학교 수의과대학

(접수: 2016년 1월 14일, 수정: 2016년 2월 22일, 게재승인: 2016년 3월 2일)

Genetic diversity of nucleocapsid genes of recent porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea

Kiju Kim¹, Yookyung Park¹, Bokyoung Park¹, Quang Lam Truong¹, Soyeon Park¹, Jaehun Kim², Tae-Wook Hahn^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63241, Korea

(Received: January 14, 2016; Revised: February 22, 2016; Accepted: March 2, 2016)

Abstract : Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), a porcine enteropathogenic coronavirus, causes lethal watery diarrhea in piglets, resulting in large economic losses because of high mortality. In November 2013, PEDV reemerged in Korea, and these outbreaks have since continuously occurred. In the present study, we determined the full-length nucleocapsid (N) gene sequences of three Korean PEDV field isolates collected in 2014–2015. Sequence and phylogenetic analysis of N genes revealed that recent prevalent Korean PEDV isolates were very closely related to the US PEDV isolates in 2013. Interestingly, the phylogenetic tree based on the nucleotide sequencing of the PEDV N gene was similar to the tree topology of the PEDV complete genomes. Therefore, our data provide a better understanding of the genetic diversity and contribute to the accurate diagnosis and development of vaccines against PEDV.

Keywords : Korean isolates, N gene, nucleocapsid, porcine epidemic diarrhea virus, phylogenetic analysis

서 론

돼지 유행성설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus [PEDV])는 극심한 수양성 설사와 탈수를 일으키는 질병으로 특히 자돈에서 매우 높은 치사율을 나타내기 때문에 전 세계적으로 경제적 손실이 상당하다 [3, 24]. PEDV는 1971년에 영국에서 최초로 발견되었으며, 이후 벨기에를 포함한 유럽과 아시아 전 지역의 양돈국가에서 발병이 보고되고 있다 [1, 17, 21]. 국내에서는 1992년 첫 발생 이후 2010년까지 매년 심각한 경제적 손실을 일으켜 왔다 [12, 15, 23]. 2010~2011년에는 돼지 구제역(foot-and-mouth disease)의 출현으로 PEDV 발생 빈도는 급격히 감소하였지만, 2013년 후반에 다시 출현한 PEDV로 인해 국내 전 지

역에 걸쳐 빠르게 확산되면서 현재까지 유행되고 있다. 특히 제주지역은 2014년 3월경, 약 10년 만에 PEDV가 다시 출현하며 매우 높은 폐사율로 인해 양돈농가에 큰 피해를 주었다 [16].

PEDV는 *Coronaviridae* family로 약 28 kb의 positive-sense, single stranded RNA genome을 가지며, 4개의 구조적 단백질(glycosylated spike [S], 150–220 kDa; membrane [M], 20–30 kDa; envelope [E], 7 kDa; nucleocapsid [N], 58 kDa)과 3개의 비구조적인 단백질(replicase 1a, replicase 1b, ORF3)로 구성되어 있다 [7, 9]. 그중 PEDV S단백질은 감염 초기에 숙주의 세포 표면과 결합하는 중요한 역할을 하기에 많은 연구가 진행되고 있지만, 유전적인 변이의 빈도가 매우 높다 [26]. 반면 N 단백질은 나선형으로 바이러스 입자

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-259-5625
E-mail: twahn@kangwon.ac.kr

의 RNA와 결합되어 있고, 유전적으로 잘 보존되어 있기 때문에 PEDV 감염 초기에 정확한 진단을 위해 널리 사용되었다 [20]. 또한 N 단백질이 보유하고 있는 항원결정기 (epitope)는 세포 매개성 면역반응을 유도하는 데 중요한 역할을 한다고 알려졌다 [5, 25]. 그럼에도 불구하고 PEDV N 유전자를 기반으로 한 연구는 매우 미미한 수준이다. 따라서 이 연구에서는 최근 국내에서 유행하는 PEDV를 대상으로 N 유전자의 염기 및 아미노산 서열을 분석하였으며, 기존에 보고된 국내의 분리주와 백신주 사이의 유전적인 특성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료의 채취

2014년에서 2015년까지 강원 및 제주 양돈농가에서 심각한 수양성 설사 증상을 보이며 폐사한 자돈을 대상으로 소장 및 분변시료를 채취하였다. 각 시료는 생리식염수를 첨가하여 강하게 현탁한 후 15,000 × g (Centrifuge 5424 R; Eppendorf, Germany)로 10분간 원심분리하였다. 상층액만 취하여 바이러스의 RNA를 추출하였으며, 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction [RT-PCR])을 이용하여 PEDV N 유전자에 특이적인 primer로 PEDV의 감염 여부를 확인하였다 [7].

RT-PCR 및 DNA cloning

PEDV의 N 유전자를 증폭하기 위해 Viral Gene-spin DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 제조사의 사용법에 따라 바이러스의 RNA를 추출하였다. cDNA의 합성은 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하였으며, -20°C에 보

관한 후 실험에 사용하였다. PCR 반응액은 cDNA template 0.1–0.5 µg, 5x GoTaq Reaction Buffer 10 µL, 25 mM MgCl₂ 4 µL, 10 mM dNTP Mix 2 µL, 10 pM upstream primer 2 µL, 10 pM downstream primer 2 µL, GoTaq DNA Polymerase (Promega, USA) 1 µL에 증류수를 첨가하여 총 50 µL가 되도록 혼합하였다. Primer는 PEDV CV777주의 유전정보를 기반으로 N-F-54(5'-TGCGG TTCTCACAGATAGTG-3')와 N-R1407(5'-AAGTCGCTAG AAAAACACTCAGT AAT-3')을 제작하여 사용하였다. PCR 반응조건은 95°C 5분간 1회, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 20초간 30회, 72°C 10분간 1회 반응하였다. 각각 증폭된 PCR 산물은 HiYield Gel/PCR DNA Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan)를 이용하여 정제한 후 TA Cloning Vector (RBC Bioscience)에 삽입하여 *Escherichia coli* DH5α competent cell (Novagen, USA) 내로 cloning을 실시하였다. 그다음 50 µg/mL ampicillin, 100 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (Duchefa Biochemie, The Netherlands) 그리고 50 mg/mL X-gal (Duchefa Biochemie)이 함유된 Luria-Bertani (BD Difco, France) 한천배지에서 배양된 흰색의 집락을 선별하여 DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology)로 plasmid DNA를 추출한 후 PEDV N 단백질 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다 (CosmoGenetech, Korea).

다중 정렬 및 계통학적 분석

최근 국내에서 유행하는 PEDV와 기존에 보고된 PEDV (Table 1)의 N 유전자를 분석하기 위해 BioEdit 7.2.5와 Clustal X 2.0 program [13]을 사용하였으며, 염기서열과 아미노산서열 정렬을 통해 상동성을 비교하여 백분위로 나타냈다. 계통학적 분석은 molecular evolutionary genetics analysis

Table 1. The recent Korean porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates and reference strains used in this study

Virus strain	Country and year	Accession number	References
CV777	Belgium, 1978	AF353511	[10]
Chinju99	Korea, 1999	AF237764	[14]
DR13/virulent	Korea, 1999	JQ023161	[22]
DR13/attenuated*	Korea, 2003	JQ023162	[22]
SM98*	Korea, 1998	GU937797	Unpublished
AH2012	China, 2012	KC210145	Unpublished
JS-HZ2012	China, 2012	KC210147	Unpublished
USA/IA1/2013	USA, 2013	KF468753	[6]
USA/IA2/2013	USA, 2013	KF468754	[6]
USA/Iowa/18984/2013	USA, 2013	KF804028	[4]
KNU-1406-1	Korea, 2014	KM403155	[18]
KUIDL-PED-2014-001	Korea, 2014	KJ588064	[2]
KOR/GW2/2015†	Korea, 2015	Unpublished	The present study
KOR/GW3/2015†	Korea, 2015	Unpublished	The present study
KOR/JJ85/2015†	Korea, 2015	Unpublished	The present study

*Korean PEDV vaccine strains. †Korean PEDV isolates sequenced in the present study.

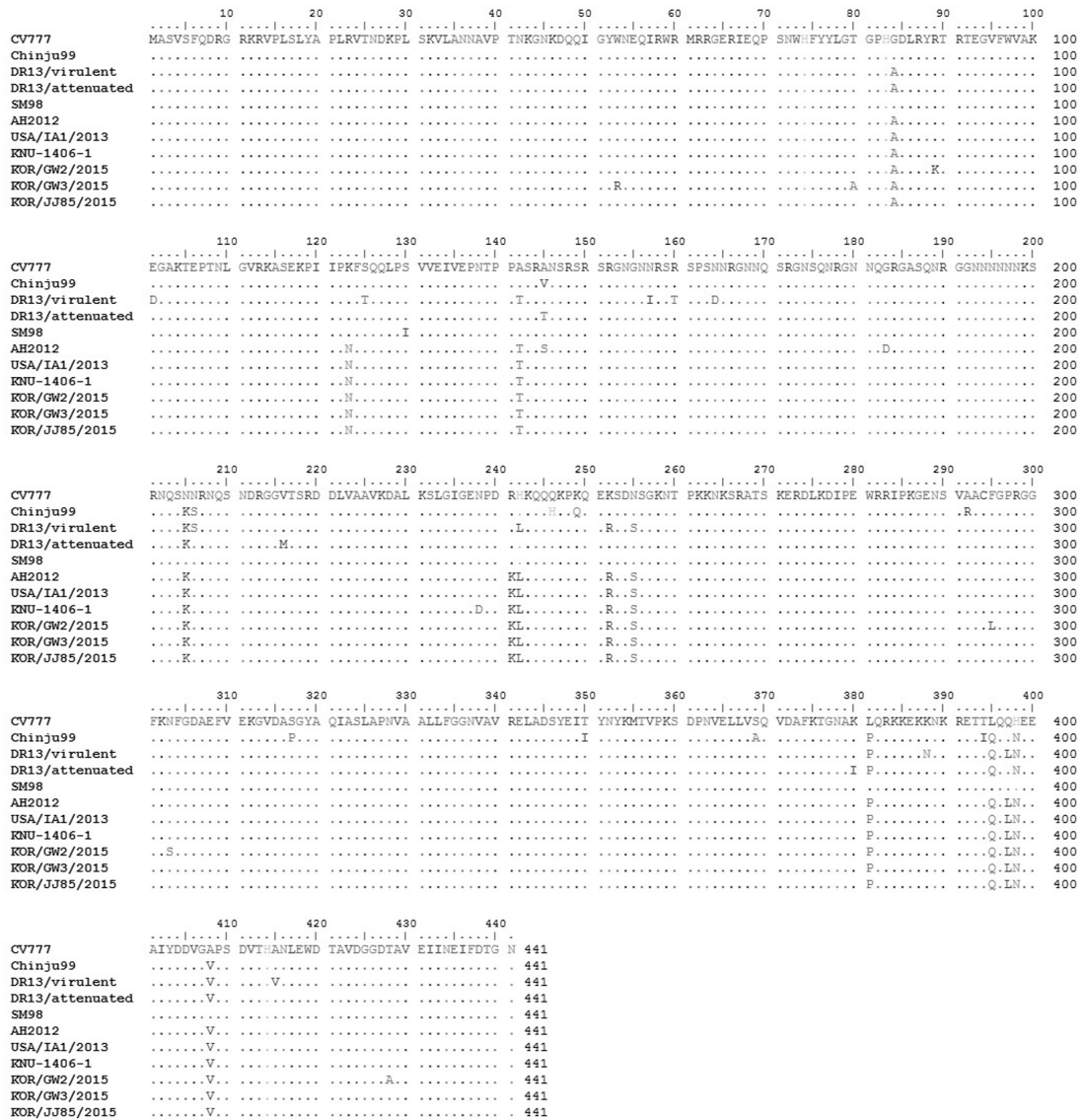


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of the N protein genes between the recent Korean porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates and reference strains. This sequences were aligned using the biological sequence alignment editor (BioEdit 7.2.5) program.

(MEGA) software version 4.0 [27]을 이용하여 neighbor-joining 방법으로 1,000회의 bootstrap을 실시하여 계통수를 생성하였다.

결 과

PEDV N 유전자의 염기서열 분석

최근 국내에서 유행하는 3개의 PEDV(KOR/GW2/2015, KOR/GW3/2015, KOR/JJ85/2015) N 유전자 염기서열을 분석한 결과 1,326 bp 길이의 염기서열과 441개의 아미노산으로 암호화되어 있었다(Fig. 1). 이를 기준에 보고된 PEDV N 유전자의 염기서열과 비교한 결과 CV777주와 95.6–95.9%, 국내 최초 분리주인 Chinju99주와 94.8–95.0%, 국내

에서 PEDV 백신주로 사용되는 DR13, SM98주와 95.5–96.8%가 일치하였다(Table 2). 반면에 2012년 중국에서 유행한 AH2012주와는 99.1–99.3%로 비교적 높은 일치율을 나타냈으며, 미국에서 유행한 USA/IA1/2013주와는 99.6–99.8%의 가장 높은 상동성을 나타냈다. 한편, 최근 국내에서 유행하는 PEDV N 유전자 사이의 염기서열 상동성은 99.1–99.5%를 나타냈다.

PEDV N 단백질의 아미노산서열 분석

PEDV N 유전자의 염기서열을 기반으로 아미노산서열 상동성을 분석한 결과 CV777주를 기준으로 13–17개 부위에서 아미노산 변이가 일어나 96.1–97.1%의 상동성을 나타냈다 (Table 2). Chinju99주와는 18–21개 부위에서 변이가 발생하

Table 2. Homology of the nucleotide and amino acid sequence of the N protein genes between the reemerging Korean PEDV isolates and reference strains

Strain	CV777	Chinju99	DR13/ virulent	DR13/ attenuated	SM98	AH2012	USA/ IA1/ 2013	KNU- 1406-1	KOR/ GW2/ 2015	KOR/ GW3/ 2015	KOR/ JJ85/ 2015
CV777	–	96.5	96.5	97.7	99.8	95.6	96.0	95.9	95.6	95.8	95.9
Chinju99	96.8	–	95.7	97.1	96.3	94.8	95.2	95.1	94.8	94.9	95.0
DR13/virulent	95.7	95.2	–	97.0	96.4	97.0	97.4	97.3	97.0	97.1	97.2
DR13/attenuated	99.3	98.2	98.4	–	97.6	96.5	96.9	96.8	96.5	96.7	96.8
SM98	99.8	96.6	95.5	99.3	–	95.5	95.9	95.8	95.5	95.6	95.7
AH2012	96.6	95.9	97.3	98.4	96.4	–	99.5	99.4	99.1	99.2	99.3
USA/IA1/2013	97.1	96.1	97.7	98.6	96.8	99.5	–	99.9	99.6	99.8	99.8
KNU-1406-1	96.8	95.9	97.5	98.6	96.6	99.3	99.8	–	99.5	99.7	99.8
KOR/GW2/2015	96.1	95.2	96.8	98.2	95.9	98.6	99.1	98.9	–	99.4	99.1
KOR/GW3/2015	96.6	95.7	97.3	98.2	96.4	99.4	99.5	99.3	98.6	–	99.5
KOR/JJ85/2015	97.1	96.1	97.7	98.6	96.8	99.5	100	99.8	99.1	99.5	–

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

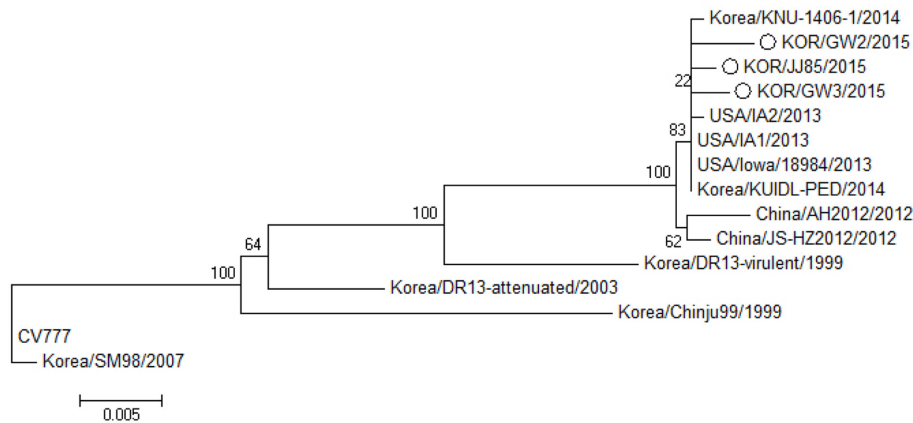


Fig. 2. Phylogenetic analyses of the recent PEDV strains (white circles) based on the nucleotide sequences of the N protein. Multiple-sequencing alignments were performed using Clustal X program and the phylogenetic tree was obtained using the neighbor-joining method. The numbers at each branch represent bootstrap values greater than 50% of 1,000 replicates. The scale bars indicate 0.005 nucleotide substitutions per site.

여 95.2–96.1%로 가장 낮은 일치율을 보였다. 또한 국내 PEDV 백신주인 DR13, SM98주와는 10–18개 부위의 변이로 인해 95.9–98.6%의 상동성을 나타냈다. 반면에 2012년 중국에서 유행한 AH2012주를 기준으로 2–5개 부위에서 변이가 일어나 98.6–99.5%로 비교적 높은 일치율을 나타냈으며, 미국에서 유행한 USA/IA1/2013주와는 0–4개의 변이로 99.1–100%의 가장 높은 상동성을 나타냈다. 한편, 최근 국내에서 유행하는 PEDV N 단백질 사이의 아미노산서열 상동성은 98.6–99.5%를 나타냈다.

계통발생의 분석

PEDV N 유전자의 염기서열을 이용하여 국내외 분리주와 계통발생을 조사한 결과 국내에서 유행하는 KOR/GW2/2015, KOR/GW3/2015 그리고 KOR/JJ85/2015주는 미국에서 분리된 USA/IA1/2013, USA/IA2/2013 그리고 USA/

Iowa/18984/2013주와 같은 계열에 속해 있었으며, 미국 분리주는 중국 분리주인 AH2012와 JS-HZ2012에서 기원한 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편, 국내 백신주로 사용되고 있는 DR13과 SM98주는 현재 유행하고 있는 PEDV와 계통발생학적으로 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

PEDV N 단백질은 바이러스의 인산화된 구조적 단백질로 바이러스에 감염된 숙주세포에서 가장 많이 발현된다 [11]. 즉, 숙주세포 내 N 단백질의 출현은 PEDV의 복제를 나타내기 때문에, 감염 초기에 정확한 진단을 할 수 있다 [20]. 또한 PEDV N 단백질을 발현하는 재조합 균주에 면역화된 마우스는 S 단백질보다 유의적으로 더 높은 수준의 비장세포 내 IL-4와 IFN- γ 를 유도했다는 보고가 있다 [19]. 이처럼

PEDV N 유전자의 변이는 감염에 대한 조기 진단과 N 유전자를 이용한 백신 개발에 영향을 미칠 수 있으므로 유전적 다양성에 관한 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 이 연구에서는 최근 국내에서 유행하는 PEDV의 N 유전자를 분석하였으며, 기존에 유행했던 국내외 분리주간의 유전적 다양성 및 계통수를 조사하였다. 그 결과 KOR/GW2/2015, KOR/GW3/2015 그리고 KOR/JJ85/2015주는 2013년 미국에서 유행했던 분리주인 USA/IA1/2013, USA/IA2/2013 그리고 USA/Iowa/18984/2013주와 가장 유사하게 나타났다. 또한 이전의 보고에 의하면 미국 분리주의 기원은 2012년 중국에서 유행한 AH2012주와 매우 밀접한 관련이 있었다 [6]. 이처럼 국내에서 유행하는 PEDV는 국내에 도착해있던 바이러스가 변이되어 발생한 것이 아니라 중국에서 미국으로, 미국에서 다시 한국으로 유입되었을 가능성이 매우 크다고 할 수 있다. 주목할만한 점은 이 연구에서 분석한 PEDV N 유전자의 계통수가 S 유전자를 기반으로 한 계통수와 매우 유사하게 나타났으며, 완전한 게놈(complete genome)의 계통수와도 상당히 일치했다는 것이다 [2, 16]. 이는 PEDV N 유전자의 분석만으로 완전한 게놈의 계통수를 추측할 수 있으므로 향후 새롭게 발생한 PEDV의 기원이나 유전적 다양성을 조사할 때 시간과 비용 절감 측면에서 매우 유용할 것으로 생각한다.

한편, 국내 PEDV 백신주로 사용되는 DR13과 SM98주는 최근 유행하는 PEDV의 N 유전자 염기서열과 비교하였을 때 3.2-4.5%, 아미노산 서열이 1.4-4.1% 변이된 것으로 나타났다. 계통수 분석에서도 상당한 거리가 있음을 알 수 있었다. 또한 국내에서 유행하는 PEDV 사이의 N 유전자 염기서열이 0.5-0.9%, 아미노산 서열이 0.5-1.4% 차이를 나타냈는데 이는 PEDV가 국내에 유입된 이래 전국으로 확산되면서 변이가 일어났음을 시사한다. 따라서 국내에서 유행하는 PEDV의 지속적인 관찰을 통해 유전자 변이에 대한 데이터베이스가 구축된다면 더 효과적인 진단 및 치료, 백신 개발에 도움이 될 것으로 보인다.

감사의 글

이 연구는 2015년도 강원대학교 학술연구구성비의 지원으로 이루어졌습니다(과제번호-520150288).

References

1. **Chen JF, Sun DB, Wang CB, Shi HY, Cui XC, Liu SW, Qiu HJ, Feng L.** Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes* 2008, **36**, 355-364.
2. **Choi JC, Lee KK, Pi JH, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee JB, Lee DH, Lee SW.** Comparative genome analysis and molecular epidemiology of the reemerging porcine epidemic diarrhea virus strains isolated in Korea. *Infect Genet Evol* 2014, **26**, 348-351.
3. **Debouck P, Pensaert M.** Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 1980, **41**, 219-223.
4. **Hoang H, Killian ML, Madson DM, Arruda PH, Sun D, Schwartz KJ, Yoon KJ.** Full-length genome sequence of a plaque-cloned virulent porcine epidemic diarrhea virus isolate (USA/Iowa/18984/2013) from a Midwestern U.S. swine herd. *Genome Announc* 2013, **1**, e01049-13.
5. **Hou XL, Yu LY, Liu J.** Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol* 2007, **123**, 86-92.
6. **Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ.** Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 2013, **4**, e00737-13.
7. **Kim SH, Lee JM, Jung J, Kim IJ, Hyun BH, Kim HI, Park CK, Oem JK, Kim YH, Lee MH, L KK.** Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013. *Arch Virol* 2015, **160**, 1055-1064.
8. **Kim SY, Song DS, Park BK.** Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2001, **13**, 516-520.
9. **Kim Y, Lee C.** Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology* 2014, **460-461**, 180-193.
10. **Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K.** Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 2001, **23**, 137-144.
11. **Kubota S, Sasaki O, Amimoto K, Okada N, Kitazima T, Yasuhara H.** Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J Vet Med Sci* 1999, **61**, 827-830.
12. **Kweon C, Kwon B, Jung T, Kee Y, Hur D, Hwang E, Rhee J, An S.** Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res* 1993, **33**, 249-254.
13. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, **23**, 2947-2948.
14. **Lee HK, Yeo SG.** Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes* 2003, **26**, 207-212.
15. **Lee S, Kim Y, Lee C.** Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112. *Virus Res* 2015, **208**, 215-224.
16. **Lee S, Ko DH, Kwak SK, Lim CH, Moon SU, Lee DS, Lee C.** Reemergence of porcine epidemic diarrhea virus on Jeju Island. *Korean J Vet Res* 2014, **54**, 185-188.
17. **Lee S, Lee C.** Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014, **20**, 1223-1226.
18. **Lee S, Park GS, Shin JH, Lee C.** Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea. *Genome Announc* 2014, **2**, e01116-14.
19. **Liu DQ, Ge JW, Qiao XY, Jiang YP, Liu SM, Li YJ.** High-level mucosal and systemic immune responses induced by oral

- administration with *Lactobacillus*-expressed porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) S1 region combined with *Lactobacillus*-expressed N protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, **93**, 2437-2446.
20. **Li Z, Chen F, Yuan Y, Zeng X, Wei Z, Zhu L, Sun B, Xie Q, Cao Y, Xue C, Ma J, Bee Y.** Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China. *Arch Virol* 2013, **158**, 1267-1273.
 21. **Oldham J.** Letter to the editor. *Pig Farming* 1972, **October** (Suppl), 72-73.
 22. **Park SJ, Kim HK, Song DS, An DJ, Park BK.** Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol* 2012, **86**, 5964.
 23. **Park SJ, Kim HK, Song DS, Moon HJ, Park BK.** Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol* 2011, **156**, 577-585.
 24. **Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C, Verheijden JH.** Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec* 1993, **132**, 129-131.
 25. **Saif LJ.** Coronavirus immunogens. *Vet Microbiol* 1993, **37**, 285-297.
 26. **Sun R, Leng Z, Zhai SL, Chen D, Song C.** Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes. *ScientificWorldJournal* 2014, **2014**, 208439.
 27. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, **24**, 1596-1599.