

2019년부터 2023년까지 국내에서 분리된 참돔이리도바이러스의 계통 분류 및 항원 결정기 예측

김국현 · 민준규 · 정현도 · 김광일[†]

부경대학교 수산생명의학과

Phylogenetic analysis and antigenic determinant prediction of red sea bream iridovirus isolated in Korea from 2019 to 2023

Guk Hyun Kim, Joon Gyu Min, Hyun Do Jeong, Kwang Il Kim[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan, 48513, Republic of Korea

In this study, we analyzed the phylogenetic classification, epitope prediction, and pathogenicity of red sea bream iridovirus (RSIV) isolated from rock bream between 2019 and 2023. Phylogenetics based on genes encoding MCP and ATPase indicated that all five RSIV isolates belonged to RSIV subtype II. The deduced amino acid sequence of the MCP for the amplicons (1362 bp) obtained from RSIV isolates had a length of 453 amino acids. Among these, the amino acid sequences of the RSIV-19, 21, 22, and 23 isolates showed 100% identity, while the RSIV-20 isolate showed 99.78% identity with one residue difference at position 306. As a result of antigenicity analysis based on amino acid sequence, the antigenicity score of the RSIV-20 isolate was 0.6386 and the other RSIV isolates were 0.6365. Additionally, the prediction of their antigenic determinants resulted in a total of 17 identical antigenic plots. When each RSIV was inoculated into rock bream, no significant differences were observed with 100% cumulative mortality in all groups. This study provides data on the potential for genetic variation of RSIV isolated in the same marine area over the past five years, and the antigenicity and pathogenicity results of each isolate are expected to be useful information for selecting future vaccine strains.

Key words: Red sea bream iridovirus, Phylogenetic analysis, Major capsid protein, Antigenic determinant

서 론

참돔이리도바이러스(red sea bream iridovirus, RSIV)는 이리도바이러스과(family *Iridoviridae*), 메갈로사이티바이러스속(genus *Megalocyttivirus*)에 속하는 정20면체의 double-stranded DNA 바이러스이

다(Kurita and Nakajima, 2012; Chinchar et al., 2017). *Megalocyttivirus*는 major capsid protein (MCP) 및 adenosine triphosphatase (ATPase) 유전자의 계통발생학적 상관관계에 따라 red sea bream iridovirus (RSIV), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), turbot reddish body iridovirus (TRBIV) 및 scale drop disease virus (SDDV) 4가지 유전형(genotype)으로 분류된다(Kurita and Nakajima, 2012; Senapin et al., 2019; Fu et al., 2021). 또한, RSIV형과

[†]Corresponding author: Kwang Il Kim
Tel: +82-51-629-5946, Fax: +82-51-629-5938
E-mail: kimki@pknu.ac.kr

ISKNV형은 계통발생에 따라 두 가지 유전자형(subtype I 및 II)으로 세분화하여 분류된다(Kim et al., 2019).

RSIV와 ISKNV는 참돔이리도바이러스병(red sea bream iridoviral disease, RSIVD)의 원인 병원체로 30종 이상의 담수어류 및 해산어류에 발생하며, 감염된 어류는 비장 비대, 무기력, 빈혈, 이상 유영 등의 임상증상을 보인다(WOAH, 2021). RSIVD는 1990년 일본의 양식 참돔에서 처음 보고된 이후 아시아 국가에 널리 분포되어 양식 산업에 막대한 피해를 끼치고 있다(Inouye et al., 1992; Lee et al., 2007; Girisha et al., 2020). 특히 우리나라의 경우, RSIV subtype II형이 주요 병원체로서 1998년 남해안 지역의 양식 돌돔에서 처음 보고된 후로, 매년 돌돔을 비롯한 다양한 해산어류에서 발생하여 양식 산업에 큰 타격을 주고 있는 풍토성 병원체로 확인되었다(Jung and Oh, 2000; Kim et al., 2019).

일반적으로 항원을 구성하는 단백질은 항체의 항원결합부위보다 크기가 커서 숙주 세포의 수용체 전체에 결합할 수 없으며, 단백질 표면에 위치한 항원 결정기에 특정 항체가 결합하여 면역 반응을 유도한다(Shih et al., 2019; Zhang et al., 2021). 따라서, 이상적인 백신 설계를 위해서는 병원체에 대한 특이 항체 생성을 유도할 수 있는 항원 결정기의 예측과 선택이 중요하다(Greenbaum et al., 2007; Zhu et al., 2019). 특히, 바이러스 입자를 구성하는 구조 단백질은 숙주 세포에서 강력한 면역 반응을 유도할 수 있는 핵심 항원 역할을 할 수 있다(Sommerset et al., 2005). *Megalocytivurs*의 경우, 구조 단백질 중 외피막 단백질은 주로 MCP 유전자로 암호화되어 있다. 특히, MCP는 바이러스 부착 및 침투에 중요한 역할을 하며, 높은 항원성으로 인해 이리도바이러스의 백신 개발 시 핵심 항원 부위로 알려져 있다(Fu et al., 2012; Liu et al., 2015). 따라서, MCP 유전자의 서열을 기초로 항원 결정기에 대한 예측과 분리주 간의 비교는 백신주 선정에서 중요한 요소이다.

본 연구에서는 RSIV의 유전적 변이 가능성을 알아보고자 2019년부터 2023년까지 국내 경남 소재 양식장의 돌돔으로부터 분리한 RSIV의 계통발생학적 분석을 통해 유전적 상관관계를 확인하였다.

또한, 새로운 백신 후보주 탐색을 위한 기초 연구로 상업용 RSIV 백신주와 최근 분리주의 구조 단백질로부터 항원 결정기를 조사하고 및 돌돔에 대한 병원성을 비교하였다.

재료 및 방법

바이러스

2019년부터 2023년까지 경남 소재의 돌돔 양식장에서 비장 비대 및 무기력 등의 임상증상을 나타내는 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)의 비장 조직에서 검출한 RSIV를 사용하였다. 또한, 국내 상업용 RSIV 백신주로 사용되는 iridovirus sachun-1 (IVS-1, RSIV subtype II; Jeong et al., 2003) 분리주를 대조구로 사용하였다.

DNA 추출 및 증폭

각 비장 조직 10mg으로부터 yesGTM Cell Tissue mini kit (GenesGen, Busan, South Korea)을 이용하여 제조사의 protocol에 따라 total DNA를 분리하였다. RSIV의 검출은 세계동물보건기구(WOAH)의 수산동물 진단 테스트 매뉴얼(Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal)에서 권고하는 PCR 방법(Kurita et al., 1998)에 따라 수행되었다(Table 1). PCR은 2X Exprime Taq Premix (GenetBio, Korea) 10μL, forward primer와 reverse primer를 각각 1 μM, DEPC treated water 7 μL, template DNA 1 μL를 혼합하여 수행하였다. 반응 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 이후, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 하는 cycle을 하나의 cycle로 하여 30 cycle 반복하였고, 이후 72°C에서 5분간 post-extension 반응시켰다. PCR 증폭 산물에서 특이적인 PCR amplicon을 확인하고자 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하였다.

계통학적 분석

PCR 분석에서 양성으로 확인된 시료를 대상으로 계통학적 분석을 위해 MCP 및 ATPase region을 Table 1의 PCR primer set을 이용하여 각각의 유전자를 증폭하였다. 각 유전자의 증폭 산물은 yesCTM

Table 1. Primers and probe used in this study

Genomic regions	Primer	Sequence (5' - 3')	Condition	Reference
<i>Pst</i> I fragment (PCR ^a)	1-F	CTC AAA CAC TCT GGC TCA TC	95°C 5 min	Kurita et al. (1998)
	1-R	GCA CCA ACA CAT CTC CTA TC	94°C 30s, 58°C 1 min, 72°C 1min ×30 72°C 7 min	
Major capsid protein (real-time PCR)	RSIV 1094F	CCA GCA TGC CTG AGA TGG A	94°C 10 min	Kim et al. (2021)
	RSIV 1221R	GTC CGA CAC CTT ACA TGA CAG G	94°C 10s, 60°C 35 ×40	
Major capsid protein (PCR)	RSIV 1177 probe	FAM-TAC GGC CGC CTG TCC AAC G-BHQ1		Kim et al. (2018)
	MCP 1F	ATG TCT GCR ATC TCA GGT GC	95°C 5 min	
	MCP 300R	CCA GCG RAT GTA GCT GTT CTC	95°C 30s,	
	MCP 600F	CAA GCT GCG GCG CTG GGA GG	1. 58°C 1 min 30s,	
	MCP 800R	GGC GCC ACC TGR CAC TGY TC	2. 72°C 1min 30s ×35	
MCP 1015F	CTC ATT TTA CGA GAA CAC CC			
MCP 1362R	TYA CAG GAT AGG GAA GCC TGC	72°C 7 min		
ATPase (PCR)	ATPase 1F	ATG GAA ATC MAA GAR TTG TCC YTG	95°C 5 min	Jeong et al. (2021)
	ATPase 218R	CAG TTR GGC AAY AGC TTG CT	95°C 30s,	
	ATPase 529F	GGG GGY AAC ATA CCM AAG C	55°C 40s,	
	ATPase 721R	CTT GCT TAC RCC ACG CCA G	72°C 40s ×35 72°C 7 min	

^aWOAH recommended PCR assay in Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal Chapter 2.3.7

Gel purification mini kit (GenesGen, Korea)를 이용하여 정제 후 ABI 9790 XL DNA Analyzer (Applied Bio- systems, USA) sequencer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. MCP 및 ATPase 유전자 서열은 ChromasPro (ver. 2.1.10.1; Technelysium, Tewantin, Australia)를 사용하여 base-calling으로 품질을 확인하였다. 또한, 백신주(IVS-1) 및 본 연구에서 분리된 5개의 RSIV에 대한 유전적 상관관계를 알아 고보가자 National Center for Biotechnology Information GenBank에 등록된 *Megalocytivirus* 유전형별 MCP 및 ATPase 유전자 염기서열을 각각 38개 및 24개를 수집하였다. 수집된 유전자 염기서열들은 BioEdit (ver. 7.7.1) 프로그램의 CLUSTAL W alignment model (Thompson et al., 1994)을 이용하여 정렬하였다. 이후 MEGA (ver. 11.0.13) 프로그램을 이용하여 maximum likelihood method를 통해 phylogenetic tree를 작성하였으며, phylogenetic tree의 branch는 1,000 bootstrap resampling을 통해 검증하였다.

RSIV 구조단백질의 항원 결정기 예측

MCP 유전자 염기서열을 아미노산 서열로 변환

후, VaxiJen v.2.0 웹 기반 도구를 통해 alignment-independent 예측을 사용하여 항원성을 평가했으며(Doytchinova and Flower, 2007), 항원 결정기는 Immune Epitope Database (IEDB)에서 Kolaskar 및 Tongaonkar의 알고리즘에 의해 예측되었다(Kolaskar and Tonganokar, 1990).

바이러스 배양 및 역가 분석

2019년부터 2023년까지 샘플링한 돌돔으로부터 적출한 5개의 돌돔 비장 조직을 각각 PBS (Phosphate-buf- fered saline, 0.1M, pH 7.2)와 1:10(w/v)으로 혼합하여 균질화한 후 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이후 상등액을 취해 0.45µm syringe-filter로 여과액을 세포 접종액으로 사용하였다. IVS-1은 참돔 지느러미 세포(*Pagrus major* fin; PMF) (Jin et al., 2011)에서 배양된 바이러스 상등액을 세포 접종액으로 사용하였다. T25 flask에서 배양된 돌돔 지느러미 세포(rock bream fin; RBF) (Jeong et al., 2021)에 여과액(200 µL) 및 IVS-1 감염된 PMF 상등액(100 µL)을 각각 접종한 후, 10% fetal bovine serum (performance plus grade; gibco, USA), 1% antibiotic-antimycotic solution (gibco, USA)

가 첨가된 L-15 배지(gibco, USA)를 첨가하고 25°C에서 7일간 세포변성효과(cytopathic effect, CPE) 생성 여부를 관찰하였다. 이후 배양액을 500 × g로 10분간 원심분리하여 상등액을 수득한 후 실험 전까지 -80°C에 보관하였다. 바이러스의 정량은 Kim et al. (2021) 방법에 따라 *Megalocytivirus*의 MCP 유전자를 표적으로 한 primer와 probe set (Table 1)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다.

돌돔 인위 감염 실험

실험어는 국내 거제에 위치한 양식장에서 돌돔(8.32 ± 2.25 g)을 구입하여 55 L 원형 수조에 20마리씩 나누어 25°C에서 14일간 순치 후 실험에 사용하였다. 인위 감염 실험 전에 실험어 중 무작위로 3마리를 선정하여 이전에 제시된 PCR 방법(kurita et al., 1998)에 따라 RSIV에 대한 무병 상태를 확인하였다(Table 1). 6개의 바이러스 배양액을 돌돔에 1.0 × 10⁵ viral genome copies/0.1 mL/fish로 20마리씩 복강 주사하여 21일간 누적 폐사율을 관찰하였고, 대조구는 PBS를 동량(100 µL) 주사하였다. 모든 실험구의 사육 수온은 실험 기간 동안 25 ± 1°C로 유지되었으며, 사료는 여체중의 2%로 하루에 한 번 급이하였고, 매일 사육수의 70%를 동일 온도의 해수로 환수하였다. 본 연구의 인위 감염 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 수행하였다 (승인 번호: PKNUACUC-2023-70).

결 과

바이러스 검출

2019년부터 2023년까지 7~10월 사이에 수집된 돌돔의 비장 조직을 이용하여 RSIV 검출에 특이적

인 PCR 분석을 수행한 결과 총 5개의 RSIV 분리주를 확인하였다(Table 2). 각 분리주는 분리된 연도를 기초로 RSIV-19, 20, 21, 22 및 23로 명명하였다.

RSIV 유전형 분석

MCP 및 ATPase 유전자 염기서열을 이용하여 돌돔에서 검출된 5개 RSIV 분리주의 계통발생학적 상관관계를 분석한 결과, 모든 RSIV 분리주는 RSIV subtype II형으로 분류되었다(Fig. 1). 또한, 백신주(IVS-1)와 분리주의 MCP 및 ATPase 유전자 염기서열 상동성을 비교한 결과, MCP 유전자의 경우 RSIV-19, 21, 22 및 23과 IVS-1 모두 100% 상동성을 보였으나 RSIV-20는 IVS-1과 99.78%의 상동성을 보였다(GenBank accession No. PP503367, PP779945, PP779946, PP779947 및 PP779948). ATPase 유전자 염기서열의 경우 RSIV 분리주 및 백신주 간 차이는 없었다(Table 3).

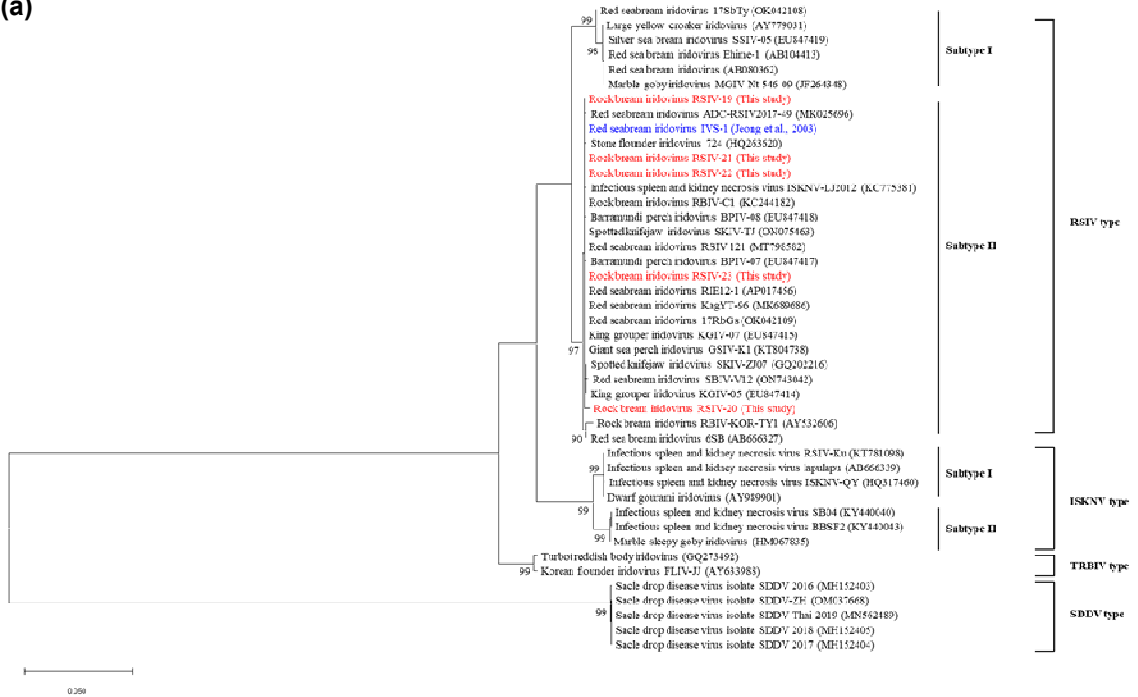
RSIV 구조단백질의 항원 결정기 예측

RSIV 분리주들의 MCP 유전자 염기서열을 아미노산 서열로 변환 후, MCP 항원의 항원성 및 항원 결정기를 예측하였다. RSIV의 MCP (1,362 bp)는 453개 아미노산으로 구성되어 있으며 RSIV-19, 21, 22, 23 및 IVS-1 분리주들의 아미노산 서열은 100% 상동성을 나타내었으나, RSIV-20 분리주에서는 306번째 잔기 하나의 차이를 보였다(Fig. 2). RSIV 분리주들의 항원성을 분석한 결과, RSIV-20 분리주의 항원성 점수는 0.6386이었고 나머지 RSIV 분리주의 항원성 점수는 0.6365로 분석되었다. 항원 결정기를 예측한 결과는 RSIV 분리주간에 차이를 보이는 306번째 잔기가 MCP 항원의 항원 결정기로 예측되지 않아 RSIV 분리주 모두에서 총 17개의 동일한 항원 플롯이 생성되었다(Fig. 3).

Table 2. Identification of RSIV isolated from rock bream in Korea by PCR assays

Isolate	Biological source	Isolated year	Sampling site	PCR (1F/1R primers)	genotype
RSIV-19	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Aug-2019	Geoje	+	RSIV subtype II
RSIV-20	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Sep-2020	Geoje	+	RSIV subtype II
RSIV-21	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Sep-2021	Geoje	+	RSIV subtype II
RSIV-22	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Oct-2022	Geoje	+	RSIV subtype II
RSIV-23	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Sep-2023	Geoje	+	RSIV subtype II

(a)



(b)

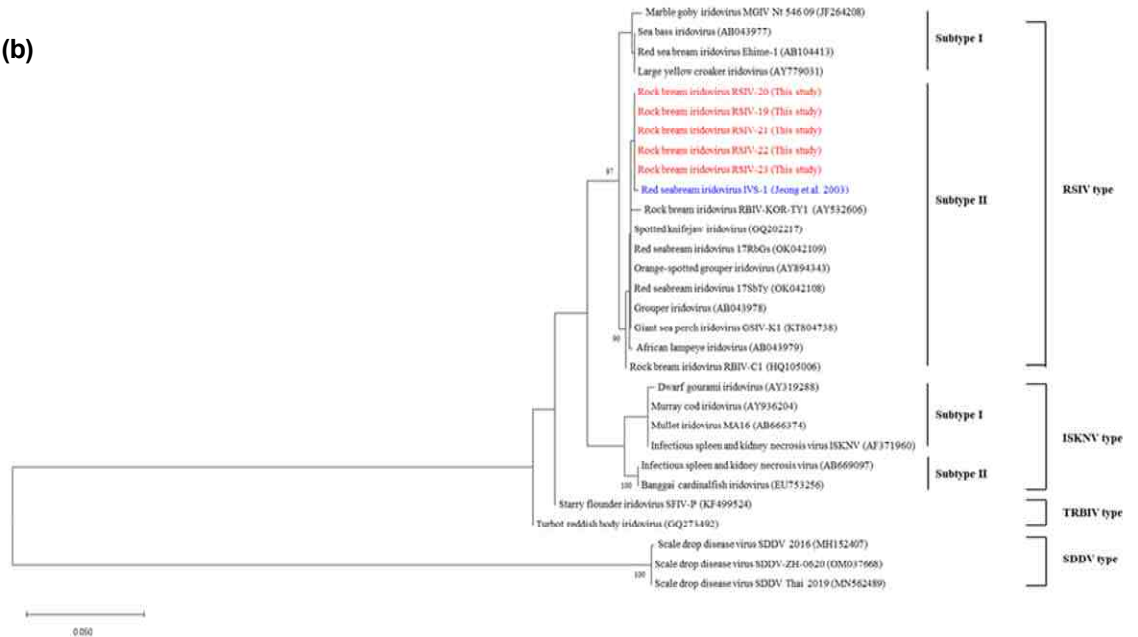


Fig. 1. Phylogenetic trees based on the complete nucleotide sequences of the (a) major capsid protein gene (MCP; 1362 bp) and (b) adenosine triphosphatase gene (ATPase; 721 bp) of five red sea bream iridovirus (RSIV) isolates (RSIV-19, 20, 21, 22, and 23) and a commercial RSIV vaccine strain (IVS-1). The five RSIV isolates (RSIV-19, 20, 21, 22, and 23) from this study are colored in red and the commercial RSIV vaccine strain (IVS-1) is colored in blue.

Table 3. Comparison of the nucleotide sequence homology of MCP and ATPase regions between RSIV isolates

(A) MCP

Isolate	RSIV-19	RSIV-20	RSIV-21	RSIV-22	RSIV-23	IVS-1
RSIV-19	100	99.78	100	100	100	100
RSIV-20	-	100	99.78	99.78	99.78	99.78
RSIV-21	-	-	100	100	100	100
RSIV-22	-	-	-	100	100	100
RSIV-23	-	-	-	-	100	100
IVS-1	-	-	-	-	-	100

(B) ATPase

Isolate	RSIV-19	RSIV-20	RSIV-21	RSIV-22	RSIV-23	IVS-1
RSIV-19	100	100	100	100	100	100
RSIV-20	-	100	100	100	100	100
RSIV-21	-	-	100	100	100	100
RSIV-22	-	-	-	100	100	100
RSIV-23	-	-	-	-	100	100
IVS-1	-	-	-	-	-	100



Fig. 2. MCP sequence alignment between RSIV isolates indicating one amino acid difference at position 306.

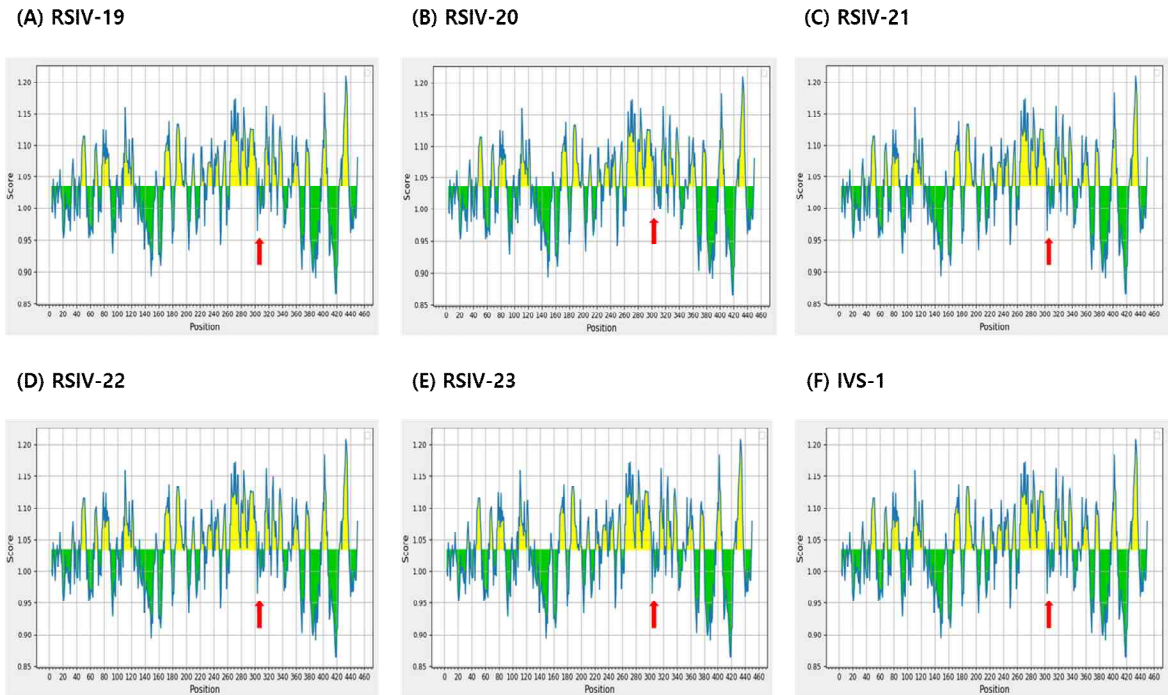


Fig. 3. The graphical representation of antigenic determinants for MCP antigens of RSIV isolates predicted using the IEDB server. The x- and y-axes represent amino acid positions and scores, respectively, and yellow peaks represent linear antigenic determinants. Prediction of antigenic determinants for the MCP antigen revealed that the peptide containing position 306 (red arrow) results in different antigenic scores between RSIV-20 and the remaining RSIV isolates.

병원성 분석

RSIV 배양액을 각각 1.0×10^5 viral genome copies/0.1 mL/fish로 돌돔에 인위 감염 후 누적 폐사율을 분석한 결과, 모든 인위 감염 그룹에서 100%의 누적 폐사율을 나타냈으며 대조군 그룹에서는 실험 종료(21일)까지 폐사가 관찰되지 않았다(Fig. 4). RSIV-19 및 21의 감염 그룹에서는 접종 11일차부터 가장 먼저 폐사가 발생하였으며, 첫 폐사 이후 3일만에 100%의 누적 폐사율을 나타내었다.

고찰

국내에서 RSIV는 1998년 돌돔에서 처음 보고된 후로, 남해안의 통영지역을 중심으로 넓게는 서해안에 이르기까지 매년 여름 25°C 이상의 수온에서 발생하여 양식산 돌돔에 큰 피해를 입히고 있다 (Jung and Oh, 2000; Sohn et al., 2000; Kim et al.,

2002). 또한, 국내 어류에서 분리된 *Megalocytivirus*의 유전형은 RSIV subtype II 유전형과 TRBIV 유전형으로 보고되었으며, 특히 RSIV subtype II 유전형은 돌돔, 참돔, 농어 등의 해산어류에서 주된 유전형으로 분포하고 있다(Do et al., 2005; kim et al., 2019). 따라서, 국내 주요 유전형인 RSIV subtype

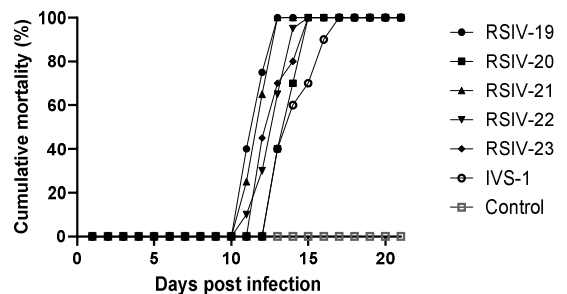


Fig. 4. Cumulative mortality (%) of rock bream infected with red sea bream iridovirus isolates.

II형의 감염을 예방하기 위해서 동일 유전형 바이러스를 백신주(IVS-1)로 사용하여 불활화 백신이 개발되어(Kwong et al., 2020), 현재 상업용 백신(IMMUNIS MEGAVAC, Woogene B&G)으로 사용되고 있는 실정이다. 본 연구의 최근 5년간 돌돔에서 분리한 RSIV도 2000년에 분리된 백신주와 동일한 유전형인 RSIV subtype II형으로 확인되었다(Fig. 1).

바이러스의 경우 동일한 유전형이나 유전자형 내에서도 서로 다른 분리주 사이에 유전적 다양성이 존재하며, 이는 바이러스 복제, 병원성, 숙주 범위 및 백신 효능에 상당한 차이를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(Oh et al., 2006; Shinmoto et al., 2009; Fu et al., 2023). 특히, 국내의 경우 2017년 양식 농어(*Lateolabrax japonicus*)에서 RSIV mixed subtype I/II의 RSIV 변이주(17SbTy)가 확인됨에 따라(Kim et al., 2019), RSIV의 유전적 다양성이 제시되어 지속적인 RSIV 유전형 감시가 필요할 것으로 사료된다. 또한, RSIV 변이주 발생 가능성에 대한 선제적인 대응을 위해서는 백신 후보주를 탐색할 필요가 있으며, 항원성과 면역원성이 높은 항원 결정기를 가지는 바이러스 분리주를 백신 후보주로 선정하는 것이 중요하다(Jechlinger, 2006; Li et al., 2014).

면역 보호 효과가 있는 항원성 단백질 및 항원 결정기를 식별하는 것은 백신 개발 과정에서 중추적인 역할을 할 수 있다(Tian et al., 2011; Skwarczynski and Toth, 2016). 특히, 바이러스 구조 단백질은 숙주의 조직이나 세포와 직접 접촉하기 때문에 면역 반응 및 항원 인식 유도과 관련된 핵심 항원으로 간주된다(Sommerset et al., 2005; Xiong et al., 2011). 이전 연구에 따르면 흰반점바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)의 구조 단백질 VP19 및 VP466을 항원으로 사용할 경우 WSSV 감염에 대해 효과적인 방어를 보였다(Musthaq and Kwang, 2015). 또한, 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, NNV)의 구조 단백질인 외피막 단백질이 항원으로서 강력한 면역 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다(Lin et al., 2023). 이리도바이러스의 주요 구조 단백질로 알려진 바이러스 외피막 단백질은 MCP 유전자가 코딩하며, 높은 항원성으로 인해

이리도바이러스 감염에 대한 백신 개발에 있어 핵심 후보 항원으로 알려져 있다(Fu et al., 2012; Liu et al., 2015; Zhao et al., 2020). 이에 따라, 본 연구에서 RSIV 분리주 및 백신주의 MCP 항원을 대상으로 항원성을 분석한 결과, RSIV-20에서 항원성 점수는 0.6386, 나머지 RSIV 분리주들은 0.6365로 나타났다으며 모든 분리주가 threshold 0.4 이상의 높은 항원성을 가지는 것으로 예측되었다. Dong et al. (2017) 연구에서 RSIV와 ISKNV의 MCP 항원에 대한 아미노산 서열은 6개 잔기 차이로 98.7% 상동성을 나타냈으며 이러한 구조적 차이로 인해 RSIV의 MCP를 기반으로 한 백신이 ISKNV에 대해 제한적인 보호를 나타냄을 확인하였다. 본 연구에서 RSIV 분리주 및 백신주 항원 결정기를 예측한 결과는 RSIV-20 분리주에서 나머지 RSIV 분리주와 비교하여 306번째 잔기 하나의 차이가 확인되었지만(Fig. 2), 해당 잔기를 포함하는 펩타이드는 항원 결정기로 예측되지 않았기 때문에 모든 RSIV 분리주는 17개의 동일한 항원 플롯이 확인되었다(Fig. 3). 이를 통해, 현재 국내 상용화된 RSIVD 예방 백신의 백신주인 IVS-1이 최근 RSIV 감염 돌돔으로부터 분리한 RSIV와 항원 결정기의 차이가 나지 않음을 확인하였으며 현재 국내에서 유행하는 RSIV에도 충분한 방어 효과를 보여줄 것으로 사료된다. 하지만, RSIV mixed subtype I/II의 RSIV 변이주(17SbTy)의 출현과 주변국에서의 ISKNV 감염 보고(Dong et al., 2017; Pattanayak et al., 2020; Girisha et al., 2021)에 따른 국내 유입 가능성이 높아짐에 따라 RSIVD 감염에 대한 효과적인 방어를 위해서는 여러 유전형의 공통 항원 또는 혼합 항원을 기반으로 한 백신 개발이 필요할 것이다.

RSIV 분리주 및 백신주를 돌돔에 각각 인위감염한 결과, 모든 그룹에서 15일 이내 100%의 누적 폐사율을 나타냈으며(Fig. 4) 이러한 결과는 본 실험과 유사한 조건으로 돌돔에 RSIV를 인위 감염하여 100%의 누적 폐사율을 확인한 이전 연구들과 유사한 결과를 보여주었다(Shin et al., 2023; Kim et al., 2024). 특히 RSIV-19 및 21은 인위 감염 후 11일차에 첫 폐사가 발생하여 3일만에 100%의 누적 폐사를 보이며 다른 RSIV 분리주 및 백신주와 비교하여 더 빠른 폐사 경향을 보여주었다. Jeong

et al. (2021)의 연구에 따르면 RSIV의 항원성 단백질의 변이가 병원성에 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 이에 따라, RSIV 분리주간의 항원 결정기 분석을 MCP 항원 뿐만 아니라 다양한 항원을 대상으로 변이 가능성을 추가 분석할 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 2019년부터 2023년까지 RSIV 감염 돌돔으로부터 분리한 RSIV의 계통학적 분석에 따른 유전형을 분류하였고 상업용 RSIV 백신주와 항원 결정기의 비교 및 돌돔에서의 병원성을 분석하였다. 모든 RSIV 분리주들은 RSIV subtype II 유전형에 속하는 것으로 확인되었다. MCP 항원의 아미노산 서열 비교 결과, RSIV-20 분리주에서 306 번째 하나의 잔기 차이를 보였지만, 해당 잔기는 항원 결정기로 예측되지 않아 모든 분리주에서 17 개의 동일한 항원 플롯이 확인되었다. RSIV 감염에 따른 폐사율은 모든 RSIV 분리주가 최종적으로 100%의 누적 폐사율을 나타냈으나, 폐사에 이르는 속도는 분리주에 따라 차이를 확인할 수 있었다. 최근 RSIV 변이주의 출현과 ISKNV 유전형의 국내 유입 가능성이 증가함에 따라, RSIVD 감염에 선제적으로 대응하기 위해 지속적으로 RSIV 분리주를 확보 및 면역원성이 높은 백신 후보주의 탐색이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgment

이 논문은 2022년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No. 2022R1I1A2064371)

References

- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q. & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, 98(5), 890-891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Do, J. W., Cha, S. J., Kim, J. S., An, E. J., Park, M. S., Kim, J. W., Kim, Y. C., Park, M. A. & Park, J. W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Archives of virology*, 150, 351-359. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0424-6>
- Doytchinova, I. A. & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*, 8, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Dong, H. T., Jitrakorn, S., Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Rodkhum, C., Rattanarojpong, T., Senapin, S. & Saksmerprom, V. (2017). Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.054>
- Fu, X., Li, N., Lai, Y., Liu, L., Lin, Q., Shi, C., Huang, Z. & Wu, S. (2012). Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 880-885. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.07.012>
- Fu, Y., Li, Y., Fu, W., Su, H., Zhang, L., Huang, C., Weng, S., Yu, F., He, J. & Dong, C. (2021). Scale drop disease virus associated yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) ascites diseases, Zhuhai, Guangdong, southern China: the first description. *Viruses*, 13(8), 1617. <https://doi.org/10.3390/v13081617>
- Fu, W., Li, Y., Fu, Y., Zhang, W., Luo, P., Sun, Q., Yu, F., Weng, S., Li, W., He, J. & Dong, C. (2023). The Inactivated ISKNV-I Vaccine Confers Highly Effective Cross-Protection against Epidemic RSIV-I and RSIV-II from Cultured Spotted Sea Bass *Lateolabrax maculatus*. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e04495-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04495-22>
- Girisha, S. K., Puneeth, T. G., Nithin, M. S., Kumar, B. N., Ajay, S. K., Vinay, T. N., Suresh, T., Venugopal, M. N. & Ramesh, K. S. (2020). Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: First report. *Aquaculture*, 520, 734712. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734712>
- Girisha, S. K., Kushala, K. B., Nithin, M. S., Puneeth, T. G., Naveen Kumar, B. T., Vinay, T. N., Suresh, T., Ajay, S. K., Venugopal, M. N. & Ramesh, K. S. (2021). First report of the infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection in ornamental fishes in India. *Transboundary and emerging diseases*, 68(2), 964-972. <https://doi.org/10.1111/>

- tbed.13793
- Greenbaum, J. A., Andersen, P. H., Blythe, M., Bui, H. H., Cachau, R. E., Crowe, J., Davies, M., Kolaskar, A. S., Lund, O., Morrison, S., Mumeey, B., Ofran, Y., Pellequer, J. L., Pinilla, C., Ponomarenko, J. V., Raghava, G. P. S., van Regenmortel, M. H. V., Roggen, E. L., Sette, A., Schlessinger, A., Sollner, J., Zand, M. & Peters, B. (2007). Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 20(2), 75-82. <https://doi.org/10.1002/jmr.815>
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. & Sorimachi, M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 27(1), 19-27. <https://doi.org/10.3147/jfsfp.27.19>
- Jechlinger, W. (2006). Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination. *Expert review of vaccines*, 5(6), 803-825. <https://doi.org/10.1586/14760584.5.6.803>
- Jeong, J. B., Jun, L. J., Yoo, M. H., Kim, M. S., Komisar, J. L. & Jeong, H. D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220(1-4), 119-133. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00538-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00538-0)
- Jeong, M. A., Jeong, Y. J. & Kim, K. I. (2021). Complete genome sequences and pathogenicity analysis of two red sea bream iridoviruses isolated from cultured fish in Korea. *Fishes*, 6(4), 82. <https://doi.org/10.3390/fishes6040082>
- Jin, J. W., Nam, J. H., Kim, K. I., Hong, S. H., Byon, J. Y. & Jeong, H. D. (2011). Characterization of the Repetitive Sequences Present in the ORF25 Genomic Region of *Megalocytiviruses* from Ornamental Fishes. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(4), 352-358. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0352>
- Jung, S. J. & Oh, M. J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beak-perch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 23(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x>
- Kim, Y. J., Jung, S. J., Choi, T. J., Kim, H. R., Rajendran, K. V. & Oh, M. J. (2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *Journal of Fish Diseases*, 25(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00345.x>
- Kim, K. I., Hwang, S. D., Cho, M. Y., Jung, S. H., Kim, Y. C. & Jeong, H. D. (2018). A natural infection by the red sea bream iridovirus-type *Megalocytivirus* in the golden mandarin fish *Siniperca scherzeri*. *Journal of fish diseases*, 41(8), 1229-1233. <https://doi.org/10.1111/jfd.12815>
- Kim, K. I., Lee, E. S., Do, J. W., Hwang, S. D., Cho, M., Jung, S. H., Jee, B. Y., Kwon, W. J. & Jeong, H. D. (2019). Genetic diversity of *Megalocytivirus* from cultured fish in Korea. *Aquaculture*, 509, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.014>
- Kim, G. H., Kim, M. J., Choi, H. J., Koo, M. J., Kim, M. J., Min, J. G. & Kim, K. I. (2021). Evaluation of a novel TaqMan probe-based real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection and quantitation of red sea bream iridovirus. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 24(11), 351-359. <https://doi.org/10.47853/FAS.2021.e34>
- Kim, K. H., Kang, G., Woo, W. S., Sohn, M. Y., Son, H. J., Kim, J. W., Kong, H. J., Kim, Y. O. & Park, C. I. (2024). Evaluation of the diagnostic assays detecting red sea bream iridovirus infection at different severity levels. *Journal of Virological Methods*, 114901. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114901>
- Kolaskar, A. S. & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172-174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. & Aoki, T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red seabream iridovirus (RSIV). *Fish Pathology*, 33: 17-23. <https://doi.org/10.3147/jfsfp.33.17>
- Kurita, J. & Nakajima, K. (2012). *Megalocytiviruses*. *Viruses*, 4: 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
- Kwon, W. J., Choi, J. C., Hong, S., Kim, Y. C., Jeong, M. G., Min, J. G., Jeong, J. B. & Jeong, H. D. (2020). Development of a high-dose vaccine formulation for prevention of megalocytivirus infection in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vaccine*, 38(51), 8107-8115. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.001>
- Lee, W. L., Kim, S. R., Yun, H. M., Kitamura, S. I., Jung, S. J. & Oh, M. J. (2007). Detection of red sea bream iridovirus (RSIV) from marine fish in the Southern coastal area and East China Sea. *Journal of fish pathology*, 20(3), 211-220. <https://www.ksfp.org/28/3262731>
- Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H. & Murthy, A. K. (2014). Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines*, 2(3), 515-536. <https://doi.org/>

- 10.3390/vaccines2030515
- Lin, T., Xing, J., Tang, X., Sheng, X., Chi, H. & Zhan, W. (2023). Immune and protective effects of subunit vaccines from S-domain or P-domain in capsid protein against nervous necrosis virus in pearl gentian grouper. *Aquaculture*, 566, 739177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739177>
- Liu, H. I., Chiou, P. P., Gong, H. Y. & Chou, H. Y. (2015). Cloning of the major capsid protein (MCP) of grouper iridovirus of Taiwan (TGIV) and preliminary evaluation of a recombinant MCP vaccine against TGIV. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28647-28656. <https://doi.org/10.3390/ijms161226118>
- Musthaq, S. K. S. & Kwang, J. (2015). Reprint of "Evolution of specific immunity in shrimp-A vaccination perspective against white spot syndrome virus". *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 342-353. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.016>
- Oh, M. J., Kitamura, S. I., Kim, W. S., Park, M. K., Jung, S. J., Miyadai, T. & Ohtani, M. (2006). Susceptibility of marine fish species to a megalocytivirus, turbot iridovirus, isolated from turbot, *Psetta maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.0>
- Pattanayak, S., Paul, A. & Sahoo, P. K. (2020). Detection and genetic analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish from non-clinical cases: First report from India. *BioRxiv*, 2020-08. <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.247650>
- Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., Sonthi, M. & Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed *Lates calcarifer* in Southeast Asia. *Journal of fish diseases*, 42(1), 119-127. <https://doi.org/10.1111/jfd.12915>
- Shinmoto, H., Taniguchi, K., Ikawa, T., Kawai, K. & Oshima, S. I. (2009). Phenotypic diversity of infectious red sea bream iridovirus isolates from cultured fish in Japan. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3535-3541. <https://doi.org/10.1128/AEM.02255-08>
- Shin, D. J., Jeong, Y. S., Kim, M. J., Kim, G. H. & Kim, K. I. (2023). Correlation between clinical changes and viral genome copy number in rock bream infected with red sea bream iridovirus. *Journal of fish pathology*, 36(2), 229-238. <http://www.ksfp.org/28/12139824>
- Shih, T. C., Ho, L. P., Wu, J. L., Chou, H. Y. & Pai, T. W. (2019). A voting mechanism-based linear epitope prediction system for the host-specific Iridoviridae family. *BMC bioinformatics*, 20, 49-58. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2736-2>
- Skwarczynski, M. & Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical science*, 7(2), 842-854. <https://doi.org/10.1039/C5SC03892H>
- Sohn, S. G., Choi, D. L., Do, J. W., Hwang, J. Y. & Park, J. W. (2000). Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. *Journal of fish pathology*, 13(2), 121-127. <https://www.ksfp.org/28/3057924>
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4(1), 89-101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tian, H., Fu, F., Li, X., Chen, X., Wang, W., Lang, Y., Cong, F., Liu, C., Tong, G. & Li, X. (2011). Identification of the immunogenic outer membrane protein A antigen of *Haemophilus parasuis* by a proteomics approach and passive immunization with monoclonal antibodies in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10), 1695-1701. <https://doi.org/10.1128/CVI.05223-11>
- Xiong, X. P., Dong, C. F., Weng, S. P., Zhang, J., Zhang, Y. & He, J. G. (2011). Antigenic identification of virion structural proteins from infectious spleen and kidney necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 919-924. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.08.009>
- WOAH, World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal. Chapter 2.3.7. Red sea bream iridoviral disease. 2021. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.07_RSIVD.pdf
- Zhao, Z., Xiong, Y., Zhang, C., Jia, Y. J., Qiu, D. K., Wang, G. X. & Zhu, B. (2020). Optimization of the efficacy of a SWCNTs-based subunit vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus in mandarin fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.062>
- Zhang, Z., Liu, G., Liu, J., Zhu, B., Wang, G. & Ling, F. (2021). Epitope screening of the major capsid protein within grouper iridovirus of Taiwan and the immunoprotective effect with SWCNTs as the vaccine

carrier. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 17-23.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.013>

Zhu, B., Zhang, C., Yang, B., Guo, Z. R., Zheng, Y. Y., Gong, Y. M. & Wang, G. X. (2019). Preliminary screening and immunogenicity analysis of antigenic epitopes of spring viremia of carp virus. *Fish &*

shellfish immunology, 94, 833-841. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.063>

Manuscript Received: May 13, 2024

Revised: May 24, 2024

Accepted: May 27, 2024