

국내 돼지에서 분리한 내인성 레트로 바이러스 gag 유전자의 분자 생물학적 특성 분석

건국대학교 동물생명과학대학 동물생명공학과, 공주대학교 산업과학대학 동물자원학과¹

이정은 · 이동희 · 유재영 · 김계웅¹ · 박홍양 · 이훈택 · 김영봉*

Molecular Characterization of Porcine Endogenous Retrovirus gag Genes from Pigs in Korea

Jungeun Lee, Donghee Lee, Jae-Young Yoo, Gye-Woong Kim¹, Hong-Yang Park,
Hoon-Taek Lee and Young Bong Kim*

Department of Biotechnology, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University,

¹Department of Animal Resource Science, College of Industrial Science, Kongju National University

Received : May 11, 2006

Accepted : June 22, 2006

Xenotransplantation, as a potential solution to the shortage of human organs, is associated with a number of concerns including immunologic rejection and xenogenic infection. While the pigs are considered the most suitable organ source for xenotransplantation, there is a potential public health risk due to zoonosis. Among the known porcine zoonotic microbes, Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) is the most considerable virus. PERV belongs to the *Gammaretrovirus* and has been divided into three groups (A, B, and C). To characterize the *gag* of PERVs, we isolated the genomic DNAs from three pig breeds (Berkshire, Duroc, and Yorkshire) and two types of SPF miniature pigs. About 1.5 kb fragments covering full length of *gag* were amplified and cloned into T-vector. A total of 38 clones were obtained and sequenced. Nucleotide sequences were analyzed and phylogenetic trees were constructed from the nucleotide and deduced amino acids. PERV-A, -B and -C were present in the proportion of 47, 19 and 34%, respectively. Regardless of origin or subgroups, *gag* clones showed highly homology in nucleotide and deduced amino acid sequences. Deduced amino acids sequence alignments showed typical conserve sequences, Cys-His box and processing sites. Among analyzed clones, about 28% of isolates had the correct open reading frame. To test the functional expression of Gag protein, *gag* was subcloned into expression vector and confirmed its expression in HeLa cell. This research provides the fundamental information about molecular characteristics of *gag* gene and functional Gag protein related xenotropic PERVs.

Key Words: PERV, Xenotransplantation, Group specific antigen, Zoonosis

서 론

장기공급의 부족 및 수요의 증가에 따른 문제점으로 인해 이종간 장기이식에 대한 필요성이 요구되고 있으며 그에 따른 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 돼지는 짧은 임신기간

을 가지고 있으며 대량 사육이 쉽고, 윤리적 논쟁을 피할 수 있는 장점으로 이종간 장기이식에서 가장 적절한 장기 공여 동물로 연구 되고 있다 (21).

이종간 장기이식은 면역학적인 거부반응, 생리적 부적합성 (physiological incompatibility), 동물 유래 질병의 인체 감염 등 여러 문제점을 안고 있다 (3). 이종간 장기이식의 실용화는 이러한 문제 중 어느 하나라도 배제 될 수 없으나 이중 동물 유래 바이러스 전염은 새로운 전염병 출현과 함께 인류를 위협할 수 있는 가능성을 지녀 더욱 주의를 요하고 있다.

*교신저자: 김영봉. 143-701, 서울특별시 광진구 화양동 1번지,
건국대학교 동물생명과학대학 동물생명공학과
Phone: 02-450-4208, Fax: 02-455-1044,
e-mail: Kimera@konkuk.ac.kr

무균사육환경 (Specific Pathogen Free)은 거의 모든 바이러스 및 세균의 감염을 제거함으로써 무균 상태의 장기 공여 돼지 사육을 가능케 하지만, 돼지 내인성 레트로 바이러스 (PERV)와 같이 germ line을 통해 전파되는 바이러스는 근본적으로 제거가 불가능하기에 이종간 장기이식 연구의 가장 큰 걸림돌로 남아 있다.

PERVs는 돼지 지능 내에 존재하여 모든 세포로부터 생성되며, 1970년대에 돼지 세포에서 C형 입자로서 처음 분리되었다. 이 C형 입자에서 Reverse Transcriptase 활성 및 C형에 특이적인 항원기를 확인하여 레트로 바이러스 입이 밝혀졌다 (4,26). 보고된 PERV 중에서는 $\gamma 1$ family 내 subgroup A, B, C 3가지 그룹이 바이러스를 만들며 감염능이 있는 것으로 알려져 있다 (1,20).

현재까지 보고된 PERV 감염성에 관해서는 A, B형이 *in vitro* 상에서 인간 세포에, *in vivo* 상에서는 면역능이 결핍된 쥐와 사람의 PERV receptor gene이 형질 도입된 쥐에 감염된 사례가 보고된 바 있다 (13,22,24). 또한 사람에게 PERV가 감염될 경우, PERV 바이러스가 돌연변이를 일으키거나 사람에게 존재하는 내인성 레트로 바이러스 (human endogenous retrovirus, HERV)와의 재조합을 일으켜 새로운 전염성 바이러스가 될 위험성을 지니고 있다. 이는 장기이식 시 환자에게 PERV가 감염되어 병원성을 일으킬 수 있는 요인임을 내포하고 있다. 따라서 돼지의 장기, 조직 및 세포를 이용한 이종간 장기이식의 경우 PERV의 제거가 반드시 선행되어야 한다.

본 연구는 gag 유전자를 이용하여 이종간 장기이식 시 PERV 제어를 위한 연구의 기초자료로 제시하고자, 국내 돼지 및 무균 돼지로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 gag 유전자를 증폭, 클로닝하여 이에 대한 분자 생물학적 특성을 연구하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 genomic DNA의 추출

본 실험에 사용된 공시재료는 국내 종돈 농장에서 사육되고 있는 Birkshire종, Duroc종, Yorkshire종, PWG Genetics Korea로부터 제공받은 무균 돼지 (M149, T1111)를 공시동물로 사용하였다. 선정된 공시동물의 모근 및 혈액의 PBMC로부터 Genomic DNA purification Kit (Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 추출된 genomic DNA는 0.7% 아가로스 겔에서 확인한 뒤, 분광계 (spectrophotometer, Beckman)를 이용, 농도를 측정 하였다. Genomic DNA는 -20℃에서 보관 후 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 위한 주형으로 사용 되었다.

2. PERV gag 유전자의 증폭 및 클로닝

gag 유전자 전체를 증폭하기 위해 Genbank에 등록된 PERV 염기서열 정보를 수집 프라이머를 제작하였다 (F; 5'-TTTTTTCATATGGGACAGACAGTGACTACC-3', R; 5'-TTGCCCCCTCGAGCTTCAAAGTAGTTACCTG-3'). 50 ng genomic DNA를 PCR 반응에 이용하였으며, 사용된 반응액은 PCR buffer 내 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTPs, primer는 각각 10 pmole, Taq polymerase 2.5 unit (SuperBio)을 이용하였다. PCR 조건은 GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer Cetus)를 이용하여, 초기 DNA 변성 과정을 94℃에서 5분 동안 1회 수행하였고, 94℃에서 denaturation 반응 30초, 57℃에서 annealing 반응 1분, 그리고 72℃에서 1분 30초간 extension 반응을 35 cycle 실시하였다. 이후 72℃에서 30분간 반응시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 증폭된 약 1.5 kb의 PCR 증폭 산물은 Gel extraction kit (Qiagen)을 사용하여 아가로스 겔로부터 분리하였으며, 정제된 PCR 산물은 pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) 및 pGEM-T easy vector (Promega)에 ligation 반응을 수

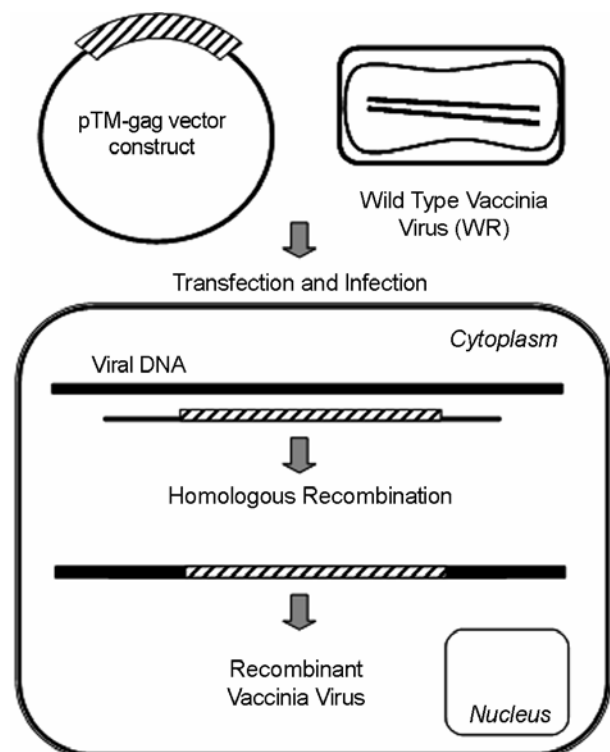


Figure 1. Construction of vaccinia virus recombinant. HeLa cells transfected with a PERV gag plasmid are infected with wild type vaccinia virus (WR). Homologous recombination occurs between flanking sequences beside gag gene and virus genomic DNA. In a consequence of PERV gag gene insertion into viral DNA, recombinant virus was produced.

행한 뒤, *E. coli* Top10F'에 형질전환을 실시하여 클로닝 하였다.

3. gag 유전자의 염기서열 분석

클로닝된 PERV gag 유전자는 M13 forward와 M13 reverse sequencing 프라이머와 PCR 반응에 사용된 프라이머 쌍을 이용하여 염기서열을 확인하였다. 염기서열 분석결과를 이용하여 약 1.5 kb의 각 클론들을 contig 하였으며, Genbank에 등록된 PERV gag 분리주들을 기준으로 DNASTAR 및 Clustal X (ver 1.8)을 이용하여 alignment를 실시하였다 (5,14).

4. 계통 발생학적 분석

클론들의 계통 분석학적 관계를 비교하기 위하여, 염기서열 분석이 완료된 38개의 클론을 Treecon (ver.1.3b)을 사용하여 계통 분석도를 작성하였다 (28). 계통 분석도는 Kimura method, Clustering (UPGMA; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)을 이용하여 작성하였으며, 계통수의 topology는 100회 반복 sampling하여 bootstrap 값을 구하

였다.

5. 재조합 백시니아 바이러스 생산

gag 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 만들기 위하여 PERV A형인 Y5 clone을 주형으로 하여 gag 유전자를 증폭하였다 (F, 5'-TTTTTTCATATGGGACAGACAGTG-ACTACC-3', R; 5'-TTTTTCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTG-3). 증폭된 gag 유전자와 T7 promotor를 가지는 pTM DH gp140 벡터를 *Nde*I, *Xho*I로 제한효소 처리한 다음 클로닝 하였다. 발현 벡터에 클로닝 된 gag 유전자 (pTM-Y5)를 HeLa (10% FBS, DMEM) 세포에 transfection한 뒤, 야생형 (wild type) 백시니아 바이러스를 감염시켰다. 그 결과 gag 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 (recombinant vaccinia)를 생산하였다 (Fig. 1).

6. Gag 단백질의 정제

gag 유전자를 가지는 재조합 백시니아 바이러스를 T7 polymerase를 생성하는 vTF7-3 바이러스와 HeLa 세포에 각

Table 1. PERV gag clones from domestic pigs and miniature pigs

Strain	Berkshire	Duroc		YK-1		M149	T1111			Total
Subtype	A	A	B	A	B	A	A	B	C	
Clones	3	8	4	4(3) ^a	3(2)	1(1)	1	1(1)	13(2)	38

()^a: number of clones have correct open reading frame

Table 2. Comparison of PERV gag nucleotide and amino acids sequences^a

Percent identity of nucleic acids ^b													(%)
	M1	Y4	Y5	Y7	T22	Y2	Y3	T2	T24	AJ279056	AJ1338186	AF038600	
M1		96.3	98.1	96.3	96.3	94.8	95.2	94.8	97.1	97.7	94.6	96.9	M1
Y4	96.9		97.1	99.4	96.6	97.9	97.9	93.5	96.4	97.1	98.3	95.8	Y4
Y5	98.6	97.7		97.1	97.7	95.6	96.0	94.9	97.3	99.0	95.6	97.1	Y5
Y7	96.9	99.7	97.8		96.2	97.5	97.9	93.1	96.4	97.1	97.9	95.4	Y7
T22	96.1	96.4	97.3	96.4		97.7	97.7	94.3	96.0	97.5	97.5	96.4	T22
Y2	94.7	97.6	95.6	97.5	98.1		99.4	92.4	94.9	95.6	99.4	94.7	Y2
Y3	95.0	97.7	96.0	97.8	98.2	99.6		92.4	95.2	96.0	99.4	94.7	Y3
T2	97.0	95.4	96.9	95.2	95.2	93.7	93.7		95.2	94.8	92.6	96.6	T2
T24	97.4	96.7	97.5	96.7	95.5	94.7	94.9	97.6		97.3	94.8	97.5	T24
AJ279056	98.7	97.6	99.1	97.6	97.0	95.4	95.7	97.1	97.5		95.4	96.9	AJ279056
AJ133816	94.3	97.5	95.4	97.5	97.9	99.4	99.4	93.6	94.4	95.2		94.5	AJ133816
AF038600	97.4	95.7	97.3	95.6	95.5	94.0	94.0	99.0	97.9	97.5	93.9		AF038600
	M1	Y4	Y5	Y7	T22	Y2	Y3	T2	T24	AJ279056	AJ1338186	AF038600	

^a The calculation was based on 1575 nucleotide and 525 amino acids each (AJ279056 was used for a reference strain of PERV-A, AJ133816 was used for a reference strain of PERV-B, AF038600 was used for a reference strain of PERV-C).

^b Percentage of nucleotide and amino acids sequence identities are presented in the upper and lower triangle respectively

Figure 2. Alignment of deduced amino acids sequences of PERV Gag. Full length nucleotide sequences of *gag* clones were identified. Deduced amino acids sequences of cloned *gag* gene clones were aligned with the reference strains (PERV-A; AJ279056, PERV-B; AJ133816, PERV-C; AF038600). Each type of clones had homology in the nucleotide sequences between 241 and 440. The sequences in shadowed boxes indicate the cleavage sites of Gag, in the closed box indicate Cys-His box.

```

1.....50...230.....250...261.....
Y5(A) MGQTVTTSLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·QRL.....
T22(B) MGQTVTTPLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·QRL.....
T2(C) MGQTVTTPLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·HRL.....
GaLV MGQDNSTPISSEWPTFGVGW·NGLVPLQYWP FSSADLYNWK·AGL.....
BaEV MGQTLTTPLSSEWPTLHVGV·VNRTIQYWP FSADLYNWK·QAL.....
FeLV MGQITITPLSAEWMNVGV·GPNNRPQYWP FSADLYNWK·VAL.....
MoMLV MGQTVTTPLSAEWPTFNVGV·GGNGQLQYWP FSSDLYNWK·GKL.....
MuLV MGQTVTTPLSAEWPTFNVGV·GGNGQLQYWP FSSDLYNWK·GKL.....
AJ279056(A) MGQTVTTPLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·QRL.....
AJ133816(B) MGQTVTTPLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·QRL.....
AF038600(C) MGQTVTTPLSSEWPTFDVGW·GQLQPLQYWP FSSADLYNWK·QRL.....

.....290...521.....550
Y5(A) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKEKGHWAR DCPKKGN..K
T22(B) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKEKGHWAR NCPKKGN..K
T2(C) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKEKGHWAR NCPKKGN..K
GaLV LLES L MFSHQPTWDD CQQLLQILFT·RPPLDKDQCA YCKEKGHWAR ECPKKH.VR
BaEV LIESI LLTHQPTWDD CQQLLQVLLT·RPKVDKDQCA YCKERGHWIK DCPKRPRDQK
FeLV LIESI LVTHQPTWDD CQQLLQALLT·KIPLGKDQCA YCKEKGHWVR DCPKRPR..K
MoMLV LIESV LITHQPTWDD CQQLLGTLT·RSQLDRDQCA YCKEKGHWAK DCPKKPRGPR
MuLV LIESV LITHQPTWDD CQQLLGTLT·RSQLDRDQCA YCKEKGHWAK DCPKKPRGPR
AJ279056(A) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKEKGHWAR DCPKKGN..K
AJ133816(B) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKEKGHWAR NCPKKGN..K
AF038600(C) LVESL MFSHQPTWDD CQQLLQTLFT·RTPLDKDQCA YCKERGHWAR NCPKKGN..K

```

Figure 3. Comparison of deduced amino acid sequence of PERV *gag* clones. PERVs (PERV-A: AJ279056, PERV-B: AJ133816, PERV-C: AF038600), GaLV (Gibbon ape leukemia virus, NC001885), BaEV (Baboon endogenous virus, AF142988), FeLV (Feline leukemia virus, K01803), MoMLV (Moloney murine leukemia virus, AF033811), and MuLV (Murine leukemia virus, AB213652) were used as references for alignment of cloned *Gag* deduced amino acids sequences. Cys-His motif in shadow region, pivotal in virus packaging, was conserved in alignment all gamma-retroviruses.

각 5 moi로 동시 감염 시켜 *Gag* 단백질을 발현하였다. *Gag* 단백질이 발현된 세포를 8 M Urea가 첨가된 Lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris.Cl, 8 M Urea, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 첨가하여 세포벽을 용해 시켰다. 원심분리 후 *Gag* 단백질이 존재하는 상층액을 취하여 Ni-NTA Agarose beads (Qiagen)와 binding 시킨 다음 Poly-Prep Chromatography Column (Biorad)에 통과시켰다. Column을 washing buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris.Cl, 8 M Urea, pH 6.3)로 2회 세척 후, elution buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris.Cl, 8 M Urea, pH 4.5)를 이용하여 단백질을 분리하였다.

결 과

1. PERV *gag* 유전자 클로닝 및 분포

개시코돈 ATG를 포함하여 전체 약 1.5 kb의 *gag* 유전자 전체를 PCR로 증폭하여 클로닝 하였으며, *gag* 전체 유전자를 지닌 38개의 바이러스 주를 확보하였다 (Table 1). Berkshire 3개, Duroc 12개, Yorkshire (YK-1)으로 부터는 7개의 *gag*를 분리 하였으며 miniature pig의 M type (M149)에서는 1개, T type (T1111)에서는 15개의 PERV *gag* 클론을 얻을 수 있었다.

확보된 클론은 M13 forward, M13 reverse sequencing 프라이머와 클로닝에 사용한 프라이머를 이용하여, 4회 이상의

Figure 4. UPGMA clustering tree based on 1.5 kb nucleotide sequences of PERV *gag*. The tree was generated by the method of Kimura (1980) on the basis of *gag* sequences using the Treecon (ver 1.3b.). Numbers at nodes indicate the bootstrap value of 100 resampled datasets. PERV-A (AJ279056 and AJ293656), PERV-B (AJ133816, AJ133818 and AJ279057), PERV-C (AF038599 and AF038600) and PERV-E (AF356698) were used reference strain. Upper scale bar means distances.

바이러스의 core를 구성하는 gag 유전자는 변이 정도가 env 유전자 보다 덜하며 잘 보존되어 있어 진단 및 백신 연구에 많이 활용되고 있다 (3). 본 실험에서 분리한 gag 클론들의 염기서열 및 아미노산 서열도 subgroup 간 또는 subgroup 내 90% 이상의 상동성을 가지는 것을 확인하였다. ORF가 맞는 클론을 포함하여 분석되어진 38개의 분리주 모두 정확한 cleavage site를 가지고 있었으며, 전체 23%가 정확한 ORF를 지니고 있어 이는 바이러스 생성 시 정상적인 PERV 바이러스 합성 가능성을 보여 주었다.

PERV gag 유전자는 발현되면 약 60 kDa의 polyprotein을 형성하고 이는 번역 후 과정을 거쳐 바이러스 단백 분해효소 (Protease; PR)에 의해 NC (Nucleocapsid) 단백질과 CA (Capsid) 단백질, 그리고 MA (Matrix) 단백질로 크게 나뉘어진다 (16,19). 본 실험에서 분리한 PERV gag 클론들의 아미노산 서열의 분석결과 MA/CA 단백질의 cleavage site가 아미노산 서열 190에서 198까지로 존재, A와 B형에서는 Glu-Ile-Ala-Ile-Leu-Pro-Leu-Arg-Thr로 C형에서는 Glu-Ile-Ala-Thr-Leu-Pro-Leu-Arg-Thr로 존재하였다. CA/NC 단백질의 cleavage site는 아미노산 서열 449에서 459까지 부분으로 A, B, C형 모두 공통임을 확인하였다 (Fig. 2). *Gammaretrovirus*에 속하는 다른 레트로 바이러스와 Gag 영역 아미노산 서열 비교에서는 종류별 변이가 있음에도 특이적으로 packaging에 관여하는 Cys-His box (18)가 동일하게 존재 함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

3. PERV gag 유전자 염기서열을 이용한 계통학적 분석

PERV gag 클론 38개의 염기서열과 Genbank에 등록된 PERV-A (AJ279056, AJ293656), PERV-B (AJ133816, AJ133818, AJ279057), PERV-C (AF038599, AF038600) 그리고 outgroup으로는 PERV-E (AF356698)를 reference 주로 선정하여 clustering 방법을 이용하여 계통 분석학적 관계를 나타내었다 (Fig. 4). B형은 93%의 bootstrap 값으로 하나의 clade를 이루며, A와 C가 포함된 하나의 clade와 B형은 100%의 bootstrap 값을 가지며 나누어짐을 확인할 수 있었다. A와 C형은 54%의 bootstrap 값을 가지며 나뉘어 졌다. Table 1에서 보인 염기서열 분석결과와 동일하게 계통 분석도 상에서도 세 가지 타입으로 나뉘어 짐을 확인하였다. gag 클론들 사이의 유전학적 또는 계통학적 거리가 상당히 가깝다는 것을 알 수 있었다.

4. 재조합 vaccinia system을 이용한 gag 유전자의 발현

Gag 단백질을 발현시키기 위해서 백신니아 (vaccinia) 바이러스를 이용하였다. gag 유전자 및 T7 프로모터를 포함한 pTM-Y5 플라스미드와 야생형 백신니아 바이러스 (WR)의

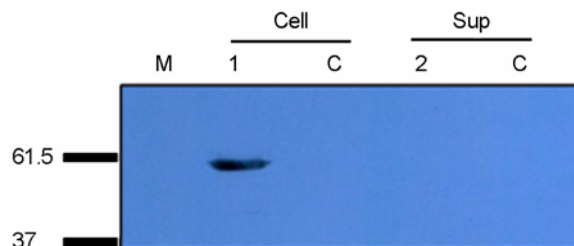


Figure 5. Immunoblot analysis of expressed PERV Gag protein. Recombinant vaccinia virus harboring PERV gag gene was amplified in HeLa cell. Amplified recombinant vaccinia virus was coinfectd with vTF7-3, vaccinia virus producing T7 polymerase, to HeLa cell (lane 1, lane 2). HeLa cell was harvested after 36 hrs later. Detection of expressed PERV Gag protein was performed by anti-His Ab. HeLa cell was used as a control (lane C). The sizes of the molecular weight markers are indicated on the left of panels.

상동재조합 (homologous recombination)을 통해 재조합 백신니아 바이러스를 구축하였다. 제작된 재조합 백신니아 바이러스와 T7 polymerase를 발현하는 vTF7-3 백신니아 바이러스를 함께 감염시켜 Gag 단백질을 발현하였다. 발현된 Gag 단백질의 C-말단에 위치하는 hexahistidine-tag을 이용하여, western blot을 실시한 결과 배양액으로 단백질이 분비되지 않고 세포 내에서만 약 60 kDa의 Gag 단백질이 검출 되었다 (Fig. 5). 이는 다른 레트로 바이러스와 같이 세포질에서 Gag polyprotein 합성이 이루어지며 (8) 이와 마찬가지로 PERV의 Gag 단백질이 세포막 외부로 분비 (secretion) 되지 않고 세포 내부, 세포질에 존재함을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구는 국내 식육용 종돈 돼지 3종류와 무균 돼지 2종류를 이용하여, 그로부터 PERV gag 유전자를 분리하였으며 그에 대한 분자 생물학적 특징 및 계통학적 분석을 수행 하였으며, Gag 단백질의 발현을 확인하였다. PERV는 전형적인 레트로 바이러스의 구조를 지닌 gag, pol, env 유전자를 지니며 이중 gag 유전자에 의해서 바이러스의 core 단백질이 만들어진다. 돼지의 유전자 안에 존재하는 많은 종류의 내인성 바이러스 유전자들은 대부분이 결실, 삽입, 혹은 점 돌연변이 등에 의해서 바이러스 입자를 생성을 하지 못하는 상태로 존재하지만 이중 바이러스를 생산하고 감염성을 지닌 PERV subgroup A, B와 C형이 알려져 있다. 본 연구를 통해 얻어진 PERV gag 유전자는 전체 Gag 단백질을 코딩하는 1.5 kb 유전자로 분리된 38개 클론 중 미니 돼지 M type에서 A형 1개, T type에서 B형 1개, C형 2개 그리고 식육 돼지 종인 Yorkshire에서 A형 3개, B형 2개의 gag 클론이 바이러스 core 단백질을 만들 수 있는 올바른 ORF를 가지고 있었

다. 이는 전체 분리된 클론 중 23%로 상당히 높은 비율을 차지하는 결과 *gag* 클론들은 실제로 감염성을 가지는 PERV를 생성해 낼 수 있는 염기서열을 지녔으며, 이는 실제 장기이식 시 간과해서는 안될 분포임을 보여주었다.

본 연구에 선행한 PERV *env* 유전자의 상동성 비교에서는 A형과 B형 간에 64~68%로 약 35% 변이가 큰 반면 *gag* 클론들의 그룹간 유전자 상동성은 최소 93% 이상, 그룹내의 상동성은 96% 이상으로 상당히 높은 수치를 보이고 있었다. 또한 백혈병, 악성종양 혹은 암을 일으키는 병원성을 지닌 레트로 바이러스의 *gag* 유전자와 높은 상동성을 보였다 (12, 27). 이를 통해 돼지의 장기나 세포의 이식 시 사람에게 존재하는 retroviral sequence인 HERV 및 기타 악성 종양 바이러스와 PERV와의 재조합을 통해 병원성을 유발하는 바이러스가 만들어질 수 있는 우려가 제기되고 있다. 본 연구에서 분리한 클론과 GalV, BaEV, FeLV, MuLV 바이러스의 아미노산 서열 비교에서도 RNA binding site인 Cys-His box 영역이 동일한 서열상을 보이며 이는 서로 다른 종의 바이러스 유전체가 cross packaging 될 수 있음을 시사하고 있으며 이에 대한 연구가 요구 되고 있다 (Fig. 3).

gag 유전자에 의해서 발현된 Gag 단백질은 크게 RNA 지놈에 결합하고 있는 NC 단백질과 핵산과 DNA 삽입효소 (Integrase; IN), PR을 함께 둘러싸고 있는 CA 부분, 그리고 Env 단백질의 TM 영역과 결합되어 있는 MA 부분으로 구성되어 있다 (2,7). Fig. 2에서 ORF가 정확한 클론들과 reference 주를 비교한 결과, 크게 2곳의 cleavage 부위가 존재하였다. 190~198을 경계로 MA와 CA 단백질이, 449~459를 경계로 CA와 NC 단백질이 나뉘어 지며, 발현된 Gag 단백질이 cleavage 되어 활성을 가질 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 본 발현 연구에서는 아직 *gag*에 대한 항체를 확보하지 못하여 anti-His 항체를 이용하였으며 polyprotein으로서 Gag에 대한 processing을 알 수 없었다. 240~440 사이의 서열은 각 type 내에서는 매우 유사하였으며, type 간에는 차이가 있으나 CA 단백질 생성에 관여하는 것 이외에는 특이 할 만한 사항이 없었다.

레트로 바이러스는 RNA 지놈을 가지고 있는데 바이러스가 만들어질 경우 실제로 바이러스 합성 및 유지에 이용되는 바이러스 RNA 이외에도 mRNA나 숙주 세포에서 유래하는 세포성 RNA 등이 존재하고 있다. 이들을 제외하고 선택적으로 바이러스의 RNA만을 둘러싸야 하는데 이때 Gag 단백질의 NC 부분이 기능을 하게 된다 (11,23). 실제로 PERV와 유사한 MuLV의 NC 부분을 제거 시키거나 돌연변이화 한 결과, 바이러스의 조립 및 viral RNA packaging을 제어한다는 것이 밝혀졌다 (17,25,30). 본 연구에서 분석한 Gag의 NC 지역에도 MuLV와 동일하게 RNA packaging에 직접적으로

관련하는 Cys-His box가 존재하였다. CA 단백질 또한 바이러스의 조립에 관여하며, 비리온의 성숙 및 viral cDNA를 핵내로 이동시키는 (nuclear transport) 기능을 하는 것으로 보고되어 있다 (7,29). MA 단백질은 Gag polypeptide를 바이러스가 조립되는 세포질로 운반하는 역할을 하며, 조립 후 바이러스의 감염능력에도 영향을 준다고 알려져 있다 (10,15). 본 연구에서 분리된 *gag* 클론들은 매우 높은 상동성을 지니며 잘 보존되어 있는 Gag 영역을 확인할 수 있어 실질적으로 기능상 결함이 없이 PERV 바이러스를 만들어 낼 수 있음을 짐작 하게 한다. 따라서 Gag 영역의 변형이나 인위적인 변이를 통해 PERV 바이러스의 제어 및 제거에 대한 접근을 제시할 수 있을 것이다. 또한 Gag 발현 시스템은 재조합 백시니아를 통하여 포유동물 세포주에서 발현 시켰기에 단백질 processing 연구가 가능하나 이를 위해선 단클론 항체 확보가 요구 되어지고 있다.

계통 분석학적인 관계를 알아보기 위하여, 염기서열이 분석된 38개 클론의 염기서열과 Genbank에 등록된 PERV-A (AJ279056 and AJ293656), PERV-B (AJ133816, AJ133818 and AJ279057), PERV-C (AF038599 and AF038600) 그리고 out-group으로 PERV-E (AF356698)를 reference 주로 사용하여, Clustering 방법으로 분석한 결과 식육 종돈 돼지 (Berkshire, Duroc, Yorkshire)와 무균 돼지 (M type, T type) 개체간의 계통분석학적 특징은 존재하지 않았다. B형은 93%의 bootstrap 값을 가지며 하나의 clade 이루고, A와 C형은 54%의 bootstrap 값을 가지며 나뉘어, 이를 통해 돼지 내에 존재하는 PERV의 *gag* 유전자가 A, B 그리고 C형으로 존재함을 확인 하였다.

gag 클론 중 A형 그룹에 속하며 올바른 ORF를 지닌 Y5 클론으로 백시니아 바이러스 발현 시스템을 이용하여 Gag 단백질을 발현 시켰으며, 약 60 kDa의 Gag 단백질을 확인하였다. 1개의 비리온 당 차지하는 Gag 단백질의 비율은 Env 단백질보다 훨씬 높으며, 바이러스가 숙주 세포에 감염된 후 세포질에서 Env 단백질은 소실되는 반면 Gag 단백질은 바이러스의 core 단백질로 잘 보존되어 있다 (9). 따라서 발현된 Gag 단백질을 항원으로 사용하여 ELISA를 이용한 PERV 검출에 사용하는 등 PERV 연구에 적용할 수 있을 것이라 사료된다.

본 연구는 이종간 장기이식에 이용되는 무균 미니 돼지 및 국내 식육 종돈 돼지 중에 존재하는 PERV *gag* 유전자의 분포 및 특성에 대한 분석, Gag 단백질의 발현을 보고하였다. 현재까지의 PERV의 *gag* 유전자 및 Gag 단백질의 기능 및 특징에 대한 연구는 상당히 부족한 실정이며 이에 따라 본 연구결과를 이종간 장기이식 시 PERV에 대한 기초자료로 제공하고자 한다. 최근까지 PERV가 특이적으로 병원성을 일

으킨 다른 사례는 없지만 잠재적인 감염성을 고려해 볼 때, 장기이식 시 PERV는 상당히 위험한 요인이기에 PERV에 대한 꾸준한 연구가 요구되며, 안정성 확보를 위해 PERV 제어에 대한 접근을 시도하여야 할 것이라고 본다.

사 사

본 연구는 농림부 바이오 장기 연구 (No. 200508030701)와 학술진흥재단 젊은 과학자 연구 (KRF-2005-F00008-100015) 지원으로 수행되었으며 제 1 저자인 이정은 학생은 서울과 학장학생 (Seoul Science Fellowship) 지원을 받았습니다.

참 고 문 헌

- 1) Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA: Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* **72**: 4503-4507, 1998.
- 2) Alin K, Goff SP: Amino acid substitutions in the CA protein of Moloney murine leukemia virus that block early events in infection. *Virology* **222**: 339-351, 1996.
- 3) Blusch JH, Patience C, Martin U: Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* **9**: 242-251, 2002.
- 4) Breese SS, Jr: Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. *Brief Report Arch Gesamte Virusforsch* **30**: 401-404, 1970.
- 5) Burland TG: DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* **131**: 71-91, 2000.
- 6) Cairns TM, Craven RC: Viral DNA synthesis defects in assembly-competent Rous sarcoma virus CA mutants. *J Virol* **75**: 242-250, 2001.
- 7) Cannon PM, Matthews S, Clark N, Byles ED, Iourin O, Hockley DJ, Kingsman SM, Kingsman AJ: Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17. *J Virol* **71**: 3474-3483, 1997.
- 8) Choi G, Park S, Choi B, Hong S, Lee J, Hunter E, Rhee SS: Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *J Virol* **73**: 5431-5437, 1999.
- 9) Craven RC, Leure-du Pree AE, Weldon RA, Jr, Wills JW: Genetic analysis of the major homology region of the Rous sarcoma virus Gag protein. *J Virol* **69**: 4213-4227, 1995.
- 10) Crawford S, Goff SP: Mutations in gag proteins P12 and P15 of Moloney murine leukemia virus block early stages of infection. *J Virol* **49**: 909-917, 1984.
- 11) D'Souza V, Summers MF: How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**: 643-655, 2005.
- 12) Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF: The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus. *J Virol* **74**: 4264-4272, 2000.
- 13) Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman E, Folks TM, Groth CG: No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**: 695-699, 1998.
- 14) Hall BG: Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Mol Biol Evol* **22**: 792-802, 2005.
- 15) Jorgensen EC, Pedersen FS, Jorgensen P: Matrix protein of Akv murine leukemia virus: genetic mapping of regions essential for particle formation. *J Virol* **66**: 4479-4487, 1992.
- 16) Jürgen H. Blusch, Sigrid Seelmeir, Klaus von der Helm: Molecular and Enzymatic haracterization of the Porcine Endogenous Retrovirus Protease. *J Virol* **76**: 7913-7917, 2002.
- 17) Kelly R. Young, Ted M. Ross: Elicitation of Immunity to HIV Type 1 Gag Is Determined by Gag Structure. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* **22**: 99-108, 2006.
- 18) Lee EG, Alidina A, May C, Linial ML: Importance of basic residues in binding of rous sarcoma virus nucleocapsid to the RNA packaging signal. *J Virol* **77**: 2010-2020, 2003.
- 19) Lee SK, Nagashima K, Hu WS: Cooperative effect of gag proteins p12 and capsid during early events of murine leukemia virus replication. *J Virol* **79**: 4159-4169, 2005.
- 20) Le Tissier, P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA: Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**: 681-682, 1997.
- 21) Magre S, Takeuchi Y, Bartosch B: Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol* **13**: 311-329, 2003.
- 22) Martina Y, Marcucci KT, Cherqui S, Szabo A, Drysdale T, Srinivisan U, Wilson CA, Patience C, Salomon DR: Mice transgenic for a human porcine endogenous retrovirus receptor are susceptible to productive viral infection. *J Virol* **80**: 3135-3146, 2006.
- 23) Meric C, Goff SP: Characterization of Moloney murine leukemia virus mutants with single-amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein. *J Viro* **63**: 1558

- 1568, 1989.
- 24) **Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME:** No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* **352**: 699-701, 1998.
 - 25) **Schwartzberg P, Colicelli J, Gordon ML, Goff SP:** Mutations in the gag gene of Moloney murine leukemia virus: effects on production of virions and reverse transcriptase. *J Virol* **49**: 918-924, 1984.
 - 26) **Todaro GJ, Benveniste RE, Lieber MM, Sherr CJ:** Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* **58**: 65-74, 1974.
 - 27) **Tristem M, Kabat P, Lieberman L, Linde S, Karpas A, Hill F:** Characterization of a novel murine leukemia virus-related subgroup within mammals. *J Virol* **70**: 8241-8246, 1996.
 - 28) **Van de Peer Y, De Wachter R:** Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comput Appl Biosci* **13**: 227-230, 1997.
 - 29) **Yamashita M, Emerman M:** Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *J Virol* **78**: 5670-5678, 2004.
 - 30) **Zhang Y, Barklis E:** Nucleocapsid protein effects on the specificity of retrovirus RNA encapsidation. *J Virol* **69**: 5716-5722, 1995.
-