Journal of Bacteriology and Virology 2006. Vol. 36, No. 2 p.125 – 132

일본뇌염바이러스 C 단백질 코딩 염기부위에 존재하는 시스-작용 유전인자에 대한 실험적 증거

충북대학교 의과대학 미생물학교실 기초의학연구소[1], 충북대학교 수의과대학 동물의학연구소[2]

윤상임[1] · 최유정[1] · 송병학[1] · 김정민[1] · 강신영[2] · 이영민[1*]

Evidence for the Presence of a *cis*-acting Element in the Coding Region of the Japanese Encephalitis Virus Capsid Protein

Sang-Im Yun[1], Yu-Jeong Choi[1], Byung-Hak Song[1], Jeong-Min Kim[1], Shien-Young Kang[2] and Young-Min Lee[1*]

[1]Department of Microbiology, College of Medicine and Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
[2]Research Institute of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Received : May 23, 2006
Accepted : June 19, 2006

Japanese encephalitis virus (JEV) is a member of mosquito-borne flaviviruses. To investigate whether there is a *cis*-acting genetic element in the coding region of the JEV C protein, which is required for viral replication, we generated four mutants by introducing a various size of deletions in each structural protein-coding region, designated as pJEV/Rep/ΔCC/LUC, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC, and pJEV/Rep/ΔE/LUC, of these, all replicons except for pJEV/Rep/ΔCC/LUC were competent in replication. Since pJEV/Rep/ΔCC/LUC is the same as pJEV/Rep/ΔC/LUC except for an additional 5' deletion (nt 132~201) in the coding region of the C protein, this region appeared to be essential for RNA replication. This is consistent with the proposed cyclization sequence motif in the 5' region of the C gene, which has been recently shown to be required for replication in other mosquito-borne flaviviruses such as DV, YFV, KUN, and WNV. Thus, our results suggest that a cis-acting genetic element in the coding region of the JEV C protein may play an important role in RNA replication. This study will facilitate the current understanding of JEV RNA replication.

Key Words: Japanese encephalitis virus, *cis*-acting element, Capsid protein, Viral replication

서 론

인체에 급성뇌염 및 마비, 혼수상태, 사망과 같은 심각한 결과를 초래하는 일본뇌염바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV)는 현재 한국을 비롯하여 동남아시아와 태평양일대 지역에서 약 16~20%에 달하는 발병률 (8,18,24)을 나타내고 있다. 더 나아가, 전 세계적으로 최근 지구 온난화 현상으로 바이러스의 중간숙주인 모기의 급속한 증가와, 대륙간의 빈번한 여행으로 바이러스의 장거리 전파 가능성이 증대됨으로 말미암아 일본뇌염바이러스를 비롯한 신경계 플라비바이러스 (neurotropic flavivirus)의 전파가 전 세계적으로 새롭게 큰 문제점으로 대두되고 있으며, 전 세계 인류의 건강을 위협하는 중요한 병원성 바이러스의 하나로 이에 대한 많은 연구가 절실히 요구되고 있다.

*Corresponding author: Young-Min Lee. Department of, Microbiology College of Medicine and Medical Research Institute Chungbuk National University 12 Gaeshin-Dong Heungduk-Ku Cheongju Chungbuk 361-763, Korea.
Phone: 043-261-2863, Fax: 043-272-1603,
e-mail: ymlee@chungbuk.ac.kr

플라비비리데 과 (Flaviviridae family)는 플라비바이러스 (flavivirus), 페스티바이러스 (pestivirus), 및 헤파시바이러스 (hepacivirus)의 세 개의 속 (genus)으로 구성되어 있다. 플라비바이러스 속에는 일본뇌염바이러스 (Japanese encephalitis virus, JEV), 황열바이러스 (yellow fever virus, YFV), 웨스트나일바이러스 (West Nile virus, WNV) 및 뎅기열바이러스 (dengue virus, DV)와 같은 인체 병원성 바이러스들이 대표적이며, 페스티바이러스 속에는 축산업에 경제적 손실을 끼치는 소설사성바이러스 (bovine viral diarrhea virus), 및 돼지콜레라바이러스 (classical swine fever virus), 양의 border disease virus들이 분류되어 있다. 이와 더불어, 헤파시바이러스 속에는 현재 C형간염바이러스 (hepatitis C virus)만이 분류되어 있다. 이들 바이러스는 단일가닥의 양성-극성 RNA 바이러스이며, 지질 외막이 바이러스의 캡시드 코어를 둘러싸고 있다 (23,25).

작은 빨간집 모기 (*Culex tritaeniorhynchus*)에 의해 전파되는 일본뇌염바이러스는 약 11 kb로 구성된 RNA 게놈을 가지고 있다. 게놈은 하나의 긴 open reading frame (ORF)을 암호화하고, ORF와 함께 게놈의 양쪽에 바이러스의 복제, 전사 및 해독에 관여하는 95 뉴클레오타이드로 구성된 5' 비번역부위 (nontranslated region)과 574 뉴클레오타이드로 구성된 3' 비번역부위의 두 개의 시스-작용 유전인자가 자리잡고 있다. 일본뇌염바이러스의 RNA 게놈은 5' 말단에 타입 I 캡 구조를 가지고 있으며, 3' 말단에 폴리 A 꼬리 [poly (A) tail]를 가지고 있지 않다. 바이러스의 ORF는 긴 하나의 다단백질로 합성되며 번역과 동시에 또는 번역 후 프로세싱 과정에 의해 최소한 3개의 구조단백질 (structural protein)과 7개의 비구조단백질 (nonstructural protein, NS)로 만들어진다. 세 개의 구조적 단백질은 5' 말단에서부터 capsid (C), premembrane (prM) 및 envelope (E) 순으로 암호화되어 있다. 또한, 바이러스의 자가복제에 필수적인 자가복제 효소 (replicase)로 구성된 7개의 비구조적 단백질들은 NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5순으로 암호화되어 있다 (4,6,7).

수많은 세포나 바이러스의 RNA 분자는 스스로 양쪽 말단 부위를 인접한 부근으로 가지고 와서 원형구조 (circular conformation)를 취할 수 있다고 잘 알려져 있다. 5' 말단과 3' 말단에 존재하는 cyclization sequence (CS) 간의 특이한 염기-결합 (base-pairing)은 'panhandle' 구조로 선형으로 구성된 바이러스 게놈 RNA의 원형화를 유도한다 (9,22). 이러한 RNA의 원형화는 기능적인 측면에서 매우 중요한 의미를 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (3,10,11,16,26). 플라비바이러스에 속하는 몇몇 바이러스의 경우, 게놈 RNA의 양쪽 말단부위에 특이하게 역으로 위치한 반복되는 염기서열 모티브가 존재한다. 모기 매개체 바이러스 게놈 RNA상의 상보적 염기서열 유전인자의 존재여부는 Hahn et al (5)에 의해서 처음으로 제안되었다. 이는 플라비바이러스에 속하는 모든 바이러스들에서 잘 보존되어 있는 것으로 보고되었다 (5). 5'-CS 유전인자는 C 단백질 (시작코돈의 아래쪽으로 약 40개의 염기)의 N-말단 부분에 위치하고 있으며, 반면에 이와 상보적 결합을 할 수 있는 3'-CS 유전인자는 3'-말단에 존재하는 stem-loop 구조의 바로 앞부분에 존재하는 것으로 제안되었다 (22).

최근의 일본뇌염바이러스를 포함하여 몇몇 플라비바이러스의 감염성이 있는 cDNA (infectious cDNA)가 성공적으로 합성되어 분자생물학적인 측면에서 플라비바이러스의 기초연구에 결정적인 전환점을 제공하고 있다. 본 연구는 세계최초로 개발한 일본뇌염바이러스 (27)의 역전사 유전자 시스템을 이용하여, C 단백질 코딩부위에 존재하는 자가복제에 중요한 역할을 하는 5' CS의 존재유무와 이들의 역할에 대해서 규명하고자 하였다. 본 연구를 통해서 앞으로 일본뇌염바이러스의 자가복제에 관여하는 RNA의 이차구조에 대한 실험과 이해에 중요한 기초를 제공할 것으로 사료된다. 또한, 바이러스의 자가복제와 관련된 기초연구결과를 이용하여 보다 안정된 예방백신 개발에도 기여할 것으로 기대한다.

재료 및 방법

1. 세포배양과 바이러스

BHK-21 세포는 10% 소태아혈청, 2 mM L-글루타민, 1X minimum essential medium (MEM) 비타민 용액, 100 U 페니실린, 및 100 μg 스트렙토마이신이 들어 있는 알파-MEM 배지에서 배양하였다. 1X MEM 비타민 용액에는 1 mg/l choline chloride, 1 mg/l D-calcium pantothenate, 1 mg/l folic acid, 2 mg/l i-inositol, 1 mg/l nicotinamide, 1 mg/l pyridoxal hydrochloride, 0.1 mg/l riboflavin, 1 mg/l thiamine hydrochloride, 및 85 mg/l NaCl가 포함되어 있다. 세포배양 시 사용한 모든 재료들은 Gibco BRL, Gaithersberg, MD, USA으로부터 구입하였다.

2. 플라스미드 제조

본 실험에 사용된 모든 플라스미드들은 pJEV/FL/LUC (27)을 기초로 하여 합성되었다. 본 연구에 사용된 프라이머는 Table 1에 요약하였다. 모든 결절 (deletion)부위는 새로운 *Xho*I 자리를 삽입함으로써 구별되며, 삽입된 *Xho*I으로 인해서 Leu과 Glu의 두 아미노산이 각각의 바이러스 단백질에 새롭게 삽입되었다. 첫째, 일본뇌염바이러스의 C 단백질 코딩부위에 결절 (nt 132~404)을 가지고 있는 pJEV/Rep/ΔCC/LUC은 다음과 같이 합성되었다. 2개의 PCR 단편 (C1과 C2)이 프라이머 DelF/C1R과 C2F/DelR를 사용하여 pJEV/FL로부터 합성되었다. 이렇게 합성된 두 개의 단편 (C1의 267-bp

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence	Polarity
DelF	5'-GATTTAATTA ACCTGCAGGGGGCTGTT	sense
C1R	5'-GATCTCGAGCCGGTTTTTACCGGGCCC	antisense
C2F	5'-GATCTCGAGAAAAGAGGAGGAAATGAA	sense
DelR	5'-TGTGGCCAAGAAGGCCAAAGCAATTGA	antisense
C3R	5'-GATCTCGAGCATTACTACCCTCTTCAC	antisense
prM1R	5'-GATCTCGAGGTCCGTGTTGTTAATGGT	antisense
prM2F	5'-GATCTCGAGGATTCAACGAAAGCCACA	sense
E1R	5'-GATCTCGAGGGCTCCACTGGCTCCTTC	antisense
E2F	5'-GATCTCGAGACAACTTTGAAGGGAGCT	sense

*Pac*I-*Xho*I 단편과 C2의 226-bp *Xho*I-*Bsi*WI 단편)은 pJEV/FL/LUC의 20,073-bp *Bsi*WI-*Pac*I과 접합시킴으로써 pJEV/Rep/ΔCC/LUC을 합성하였다. 둘째, 일본뇌염바이러스의 C 단백질 코딩부위에 결절 (nt 201~404)을 가지고 있는 pJEV/Rep/ΔC/LUC은 다음과 같이 합성되었다. C3 PCR 단편이 pJEV/FL로부터 프라이머 DelF/C3R을 사용하여 증폭되었다. 이렇게 증폭된 산물의 336-bp *Pac*I-*Xho*I 단편을 pJEV/Rep/ΔCC/LUC의 12,850-bp *Xho*I-*Rsr*II 및 7,449-bp *Rsr*II-*Pac*I 단편들과 접합시킴으로써 pJEV/Rep/ΔC/LUC를 합성하였다. 셋째, 일본뇌염바이러스의 prM 단백질 코딩부위에 결절 (nt 531~812)을 가지고 있는 pJEV/Rep/ΔprM/LUC은 다음과 같이 합성되었다. 2개의 PCR 단편 (prM1과 prM2)이 프라이머 DelF/prM1R과 prM2F/DelR를 사용하여 pJEV/FL로부터 합성되었다. 이렇게 합성된 두 개의 단편 (prM1의 666-bp *Pac*I-*Xho*I 단편과 prM2의 1,616-bp *Xho*I-*Sfi*I 단편)은 pJEV/FL/LUC의 10,264-bp *Sfi*I-*Nsi*I 및 8,011-bp *Nsi*I-*Pac*I 단편들과 접합시킴으로써 pJEV/Rep/ΔprM/LUC을 합성하였다. 마지막으로, 일본뇌염바이러스의 E 단백질 코딩부위에 결절 (nt 1,032~2,201)을 가지고 있는 pJEV/Rep/ΔE/LUC은 다음과 같이 합성되었다. 2개의 PCR 단편 (E1과 E2)이 프라이머 DelF/E1R과 E2F/DelR를 사용하여 pJEV/FL로부터 합성되었다. 이렇게 합성된 두 개의 단편 (E1의 1,167-bp *Pac*I-*Xho*I 단편과 E2의 227-bp *Xho*I-*Sfi*I 단편)은 pJEV/FL/LUC의 10,264-bp *Sfi*I-*Nsi*I 및 8,011-bp *Nsi*I-*Pac*I 단편들과 접합시킴으로써 pJEV/Rep/ΔE/LUC을 합성하였다.

3. *In vitro* 전사반응 (*In vitro* transcription)

약 100~200 ng의 wild-type 또는 재조합 cDNA 플라스미드를 *Xba*I 제한효소를 이용하여 절단함으로써 *in vitro* 전사반응시 필요한 런-오프 자리 (run-off site)를 만들었다. 절단된 cDNA들은 페놀-클로로포름으로 추출하고 에탄올을 이용하여 침전시킨 후, 20 μl nuclease-free dH_2O에 녹임으로써 RNase-free DNA 주형을 준비하였다. 이후, *In vitro* 전사반응액은 0.6 mM cap analog [m7G(5')ppp(5')G, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA], 10 mM DTT, 1 mM의 각각 UTP, GTP, CTP, ATP, 40 U의 RNase OUT, 15 U의 SP6 RNA 중합효소를 90분 동안 37℃에서 반응하였다. 반응액의 1~1.5 μl를 아가로즈 겔을 사용해 전기영동을 함으로써 확인하였다.

4. 형질전환 (Transfection)

BHK-21 세포 (3×10^6)는 형질전환 하루 전에 p150 mm 배양접시에 분주하여 준비하였다. 형질전환을 위해서 세포는 다음과 같이 처리하였다. 아포화 상태로 적절하게 자란 BHK-21 세포를 트립신 처리를 하여 배양접시에서 분리하였다. 트립신 처리된 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)로 3번 반복적으로 세척을 실시하였다. 세척 후, 세포 (8×10^6 cell/ml)를 PBS를 사용하여 재부유시켰다. 이렇게 준비된 세포를 1~2 μg의 *in vitro* 전사반응으로 얻은 RNA 전사체와 섞은 다음, 0.4-cm electroporation cuvette (ECM 830, BTX Inc., San Deigo, CA, USA)에 옮긴 후 980 V와 99 μs에서 5번 pulse를 실시하였다.

5. 루시퍼레이즈 효소활성 분석 (Luciferase assay)

형질전환된 세포를 6-웰 (well) 플레이트에 분주하였다. 각 웰은 PBS로 두 번씩 세척하였다. 세포는 200 μl의 용해버퍼 (25 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM EGTA, 1% [v/v] Triton X-100)를 사용하여 용혈시킨 후, 상온에서 20분 동안 배양하였다. 이후에, 세포 잔해를 제거하기 위해서 세포용해물을 2분간 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액만을 수확하였다. 10~20 μl의 세포추출액을 100 μl의 루시퍼레이

즈 효소활성 분석 반응시약 [20 mM Tricine, 1.07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 2.67 mM $MgSO_4$, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 μM coenzyme A (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 470 μM luciferin (Promega, Madison, WI, USA), 530 μM ATP]와 섞어서 곧 바로 루시퍼레이즈의 효소활성을 Luminometer TD20/20을 사용하여 분석하였다. 실험은 3번 반복하였으며, 이들의 평균 relative light unit (RLU)을 본 실험결과에 나타내었다.

6. 웨스튼 블롯 분석 (Western blot)

형질전환된 BHK-21 세포의 용해물을 1× ample loading buffer (80 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2.0% sodium dodecylsulfate [SDS], 10% glycerol, 0.1 M DTT, 0.2% bromophenol blue)를 사용하여 용해시킴으로써 세포용해물을 준비하였다. 세포용해물의 전체단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 다음, PVDF membrane에 옮긴 후, 1차 항체로 일본뇌염바이러스에 특이적으로 반응하는 항혈청을 사용하여 PVDF membrane을 1:1000 희석하여 2시간 동안 염색하였다. 1차 항체로 염색된 membrane은 alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-rabbit Ig G 항체로 1:5000 희석하여 2시간 동안 염색하였다. 염색된 일본뇌염바이러스의 단백질은 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate와 nitroblue tetrazolium 기질을 사용하여 발현유무를 시각화하였다.

결 과

본 연구에서는 다른 플라비바이러스의 C 단백질 코딩부위에 존재하는 것으로 제안된 5'-CS 유전인자를 토대로 하여, 일본뇌염바이러스의 구조단백질 코딩부위에 어떠한 시스-작용 유전인자가 존재하는 지를 분석하고자 하였다. 먼저 Fig. 1에 나타낸 것과 같이, 일본뇌염바이러스의 infectious cDNA를 기초로 하여 바이러스의 구조단백질 코딩부위에 다양한 크기의 결절 (deletion)을 엔지니어링한 재조합 돌연변이들을 합성하였다. 이들 돌연변이들의 합성 시 이들의 자가복제 여부를 정량적 및 정성적으로 쉽게 분석하고자 RNA 자가복제에 의존적으로 루시퍼레이즈 리포터 유전자가 발현되도록 디자인하였다. 즉, encephalomyocarditis virus의 internal ribosome entry site 유전인자 (EMCV IRES)에 의해 발현이 조절되는 루시퍼레이즈 리포터 유전자 발현카세트를 일본뇌염바이러스의 3' NTR 바로 앞 부분에 삽입하였다. 이와 같은 목적으로 본 실험을 위해서 pJEV/Rep/ΔCC/LUC, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC 및 pJEV/Rep/ΔE/LUC로 명명

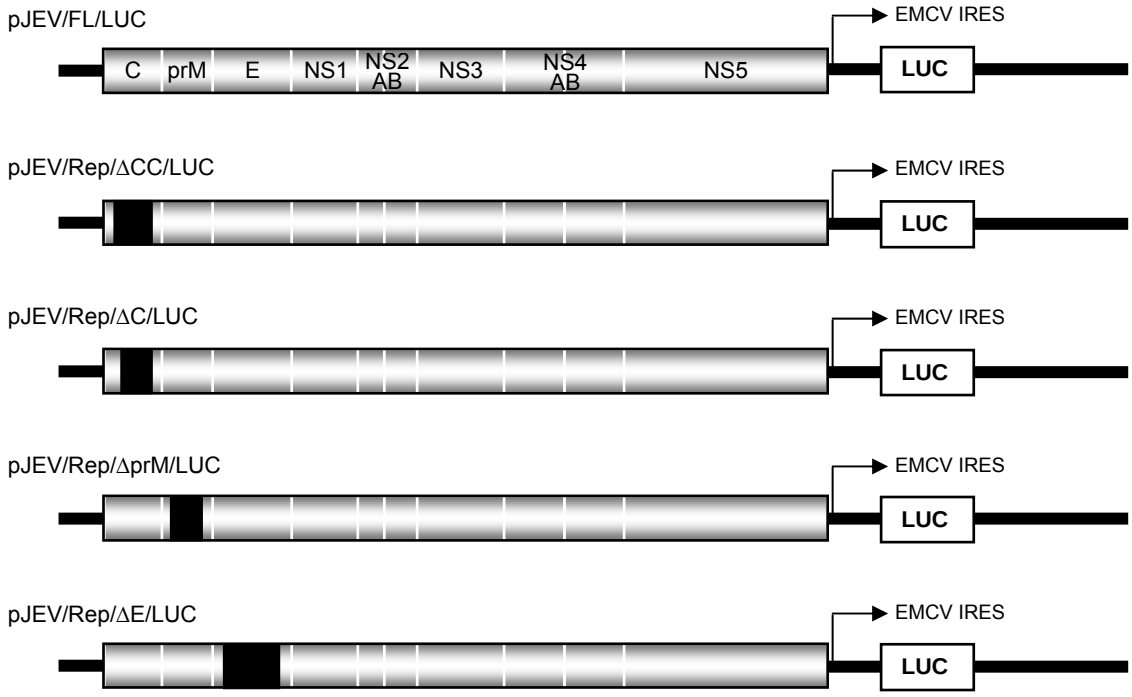

Figure 1. Construction of JEV viral replicons. The structures of the JEV viral replicons are shown. Solid boxes (■) indicate in-frame deletions that had been introduced into the genome of the infectious pJEV/FL/LUC construct. Four constructs, namely, pJEV/Rep/ΔCC/LUC, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC, and pJEV/Rep/ΔE/LUC, contain a single in-frame deletion in each structural gene of JEV. pJEV/Rep/ΔCC/LUC has a deletion that extends to the proposed cyclization sequence motif in the 5' region of the C gene, unlike pJEV/Rep/ΔC/LUC. EMCV IRES, Internal ribosome entry site element of encephalomyocarditis virus; LUC, luciferase gene.

된 모두 4개의 돌연변이들을 합성하였으며, 각각은 C 유전자의 nt 132~404, C 유전자의 nt 201~404, prM 유전자의 nt 531~812 및 E 유전자의 nt 1,032~2,201 부위가 결절되었다 (Fig. 1).

이렇게 합성된 재조합 cDNA를 주형으로 사용하여 SP6 RNA 중합효소를 사용한 *in vitro* 전사반응을 통해서 각각의 RNA 전사체를 합성하였다. 합성된 RNA를 1% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동을 실시함으로써, 이들의 합성여부와 전체적인 보전상태를 분석하였다. Fig. 2에 나타낸 것과 같이, 각각의 돌연변이 RNA 전사체들은 wild-type JEV/FL/LUC RNA와 유사하게 합성되었음을 확인하였다. 이렇게 합성된 RNA 전사체를 BHK-21 세포에 electroporation을 수행함으로써 형질전환시켰다. 형질전환된 RNA 전사체의 자가복제 여부를 분석하기 위해서, 동일한 양의 형질전환된 세포를 주어진 시간에 각각 용해하여 RNA 전사체로부터 발현된 루시퍼레이즈의 활성을 분석하였다. pJEV/Rep/ΔCC/LUC RNA의 경우, 형질전환 6시간이 경과한 후 형질전환된 세포로부터 발현된 루시퍼레이즈의 활성은 약 5.2×10^3 RLU으로 측정되었으며, 이 활성은 시간이 지남에 따라서 점차적으로 감소하여 형질전환 후 96시간이 경과한 다음에는 약 8.8 RLU까지 감소하였다 (Fig. 3, ●). 이 수치는 형질전환되지 않은 BHK-21 세포에서 측정되는 배경수준의 수치 (background level)이다 (Fig. 3, 점선). 이와는 대조적으로, 나머지 3가지의 경우 (pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC 및 pJEV/Rep/ΔE/LUC), 형질전환 6시간이 경과한 후 형질전환된 세포에서 발현되는 루시퍼레이즈의 활성은 pJEV/Rep/ΔCC/LUC RNA로 형질전환된 세포에서 발현되는 활성과 유사한 약 5.9×10^3 RLU이였으나, 이 활성은 시간이 지남에 따라서 급격히 증가하였다 (Fig. 3). 형질전환 후 48시간이 경과한 다음에는 이들의 활성은 약 2.7×10^6 RLU까지 증가하였으며, 그 이후 점차적으로 감소하였다 (Fig. 3).

또한, BHK-21 세포에 형질전환된 각각의 RNA 전사체의 자가복제 여부는 형질전환된 RNA로부터 바이러스 단백질이 새롭게 합성되는 지를 분석함으로써 재검증하였다. 이를 위

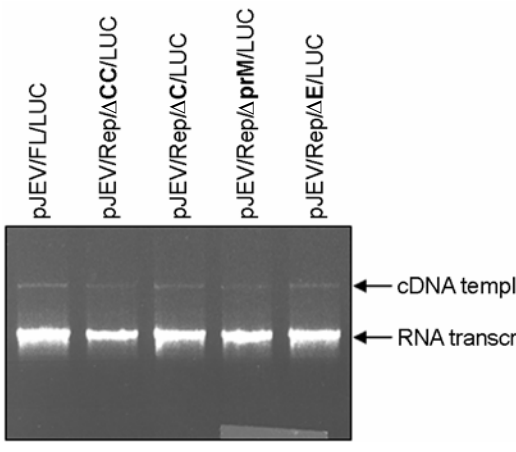

Figure 2. Generation of the synthetic RNA transcripts *in vitro* transcribed from pJEV/Rep/ΔCC/LUC, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC, and pJEV/Rep/ΔE/LUC cDNA templates. Each cDNA as indicated was linearized by *Xba*I digestion. Linearized cDNA templates were used for *in vitro* transcription reaction using the SP6 RNA polymerase. 1~1.5 μl of the reaction mixtures was analyzed by 0.5% agarose gel electrophoresis. cDNA templates and RNA transcripts as indicated were visualized by ethidium bromide staining.

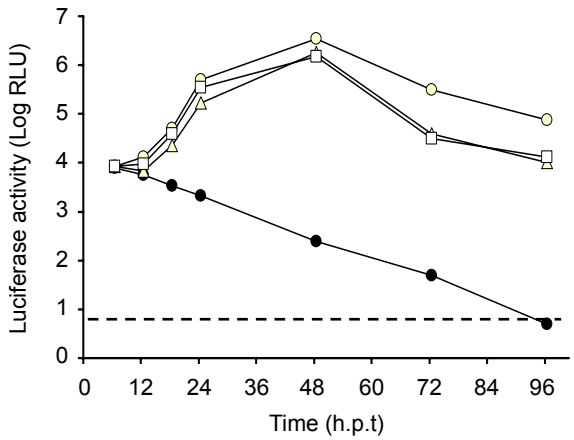

Figure 3. Expression of LUC. Naive BHK-21 cells (8×10^6) were transfected with 2 μg of the parent or JEV viral replicon RNAs that had been transcribed from each cDNA template and then seeded on 6-well plates at a density of 4×10^5 cells per well. At the indicated time points, the cell lysates were subjected to luciferase assays. The experiments were performed in triplicate and the mean values are shown. Solid circle, pJEV/Rep/ΔCC/LUC; open circle, pJEV/Rep/ΔC/LUC; open triangle, pJEV/Rep/ΔprM/LUC; open square, pJEV/Rep/ΔE/LUC. A dotted line indicates the level of background luminescence of naïve cells. hpt, hours post-transfection.

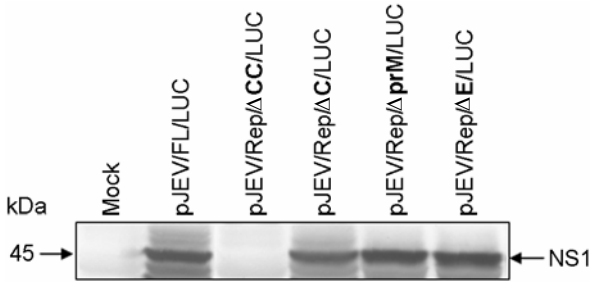

Figure 4. Expression of JEV NS1 protein. The transfected cells (4×10^5) as indicated were lysed with 1X sample loading buffer 48 hr post-transfection and the protein extracts were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were transferred onto the nitrocellulose membrane and immunoblotted with a JEV hyperimmune antiserum.

Table 2. 플라비바이러스의 cyclization sequence

Virus	5'CS	3'CS
DEN-1	UCAAUAUGCUG	CAGCAUAUUGA
DEN-2	UCAAUAUGCUG	CAGCAUAUUGA
DEN-3	UCAAUAUGCUG	CAGCAUAUUGA
DEN-4	UCAAUAUGCUG	CAGCAUAUUGA
JEV	UCAAUAU–GUG	CAC–AUAUUGA
WNV	GUCAAUAUGCUA	AGCAUAUUGAC
MVE	GUCAAUAUGCUA	AGCAUAUUGAC
YFV	CCCUGGGCGUCAAUAUGGU	ACCAUAUUGACGCCAGGG

해서, 각각의 RNA로 형질전환된 후 48시간이 경과한 다음 일본뇌염바이러스의 단백질에 특이적으로 반응하는 마우스 혈청을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (Fig. 4). 루시퍼레이즈 활성도 측정과 마찬가지로, 3개의 cDNA (pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC 및 pJEV/Rep/ΔE/LUC)로부터 합성된 RNA로 형질전환된 세포에서는 일본뇌염바이러스의 NS1 단백질의 발현이 확인되었으나, pJEV/Rep/ΔCC/LUC RNA로 형질전환된 세포에서는 NS1 단백질의 발현이 탐지되지 않았다 (Fig. 4).

본 실험결과, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC 및 pJEV/Rep/ΔE/LUC를 포함하는 3개의 재조합 cDNA로부터 합성된 RNA는 자가복제를 할 수 있으나, pJEV/Rep/ΔCC/LUC cDNA로부터 만들어진 RNA는 자가복제를 할 수 없는 것을 알 수 있었다.

고 찰

일반적으로 바이러스의 자가복제에 관여하는 시스-작용 유전인자의 경우는 단백질을 인코딩하지 않는 비번역부위를 위주로 많은 연구가 진행되었다. 플라비바이러스의 경우, 게놈 RNA의 양쪽 말단에 존재하는 5' 및 3' NTR 부위에 대한 시스-작용 유전인자들이 여러 가지 실험기법을 이용하여 지금까지 많은 연구가 보고된 바 있다 (22). 본 연구에서는 일본뇌염바이러스의 infectious cDNA를 이용하여 바이러스의 자가복제에 필수적인 시스-작용 유전인자가 바이러스 C 단백질의 N-말단 부위에 존재한다는 것을 증명하였다. 즉, 본 실험에서 사용된 두 개의 결절 돌연변이인 pJEV/Rep/ΔCC/LUC과 pJEV/Rep/ΔC/LUC은 각각 C 단백질 코딩부위 nt 132~404과 nt 201~404에 결절된 부위를 가지고 있는 것을 제외하면, 다른 일본뇌염바이러스의 유전인자 및 유전자 부위는 동일하다. 이 중에서 pJEV/Rep/ΔC/LUC RNA는 자가복제를 하였으나, pJEV/Rep/ΔCC/LUC RNA는 자가복제를 하지 않았다. 그러므로, nt 132~201 부위에 일본뇌염바이러스의 RNA가 자가복제를 수행하는 데 중요한 역할을 하는 시스-작용 유전인자가 존재함을 의미한다.

최근의 연구결과 일본뇌염바이러스가 속해 있는 플라비바이러스 중에서 Kunjin virus, YFV, WNV 및 DV의 경우, 바이러스의 C 단백질 코딩부위에 바이러스 RNA의 자가복제에 필수적인 시스-작용 유전인자가 존재함이 보고된 바 있다 (1,2,17,19,21). 이들 논문에 따르면, 바이러스 게놈 RNA의 3' 말단부위에 위치한 stem-loop 구조 바로 앞 부분에 8개의 염기가 바이러스의 C 단백질 N-말단부위에 있는 8개의 염기와 상보적인 결합을 할 수 있다고 보고하였다. 또한, 이러한 염기-결합 (base-pairing)은 바이러스 게놈의 5' 말단과 3' 말단을 물리적으로 가까운 위치에 배열함으로써 바이러스의 자가복제에 중요한 역할을 할 것으로 제안하고 있다. Table 2에 본 연구결과 밝혀진 일본뇌염바이러스 게놈 RNA 상의 nt 132~201 부위에 존재하는 시스-작용 유전인자를 다른 플라비바이러스들과 비교 분석하였다. 하지만, 아직까지 이러한 장거리 상호작용이 어떻게 바이러스 게놈 RNA의 자가복제에 영향을 미치는 지와 바이러스의 RNA 자가복제 과정 중에서 정확히 어떤 단계에서 역할을 하는 지에 관한 연구결과는 아직 보고되지 않았다. 이와 더불어, 플라비비라데과 (family)에 속하는 3 개의 속 (genus)들 중에서 플라비바이러스는 게놈의 5' 말단에 위치한 캡 구조에 의존적으로 바이러스의 번역 (translation)이 이루어진다. 하지만, 나머지 두 속 (genus)에 속하는 바이러스들 즉, 페스티바이러스와 헤파시바이러스의 경우 바이러스의 5' NTR이 IRES의 기능을 함으로써 바이러스의 번역이 캡 구조에 비의존적으로 이루어진다. 따라서 본 연구결과 밝혀진 일본뇌염바이러스의 자가복제에 필수적인 시스-작용 유전인자가 cap 구조에 의존적으로 이루어지는 바이러스의 번역에는 어떠한 역할을 하는

지도 앞으로 밝혀야할 중요한 연구과제로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2003-002-E00136).

참 고 문 헌

1) **Ackermann M, Padmanabhan R:** De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* **276:** 39926-39937, 2001.

2) **Alvarez DE, Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV:** Role of RNA structures present at the 3UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* **339:** 200-212, 2005.

3) **Blumenthal T, Carmichael GG:** RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annu. Rev. Biochem.* **48:** 525-548, 1979.

4) **Burke DS, Monath TP:** Flaviviruses, p. 1043-1125. In D.M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B, Roizman, and S. E. Straus (ed.). *Fields virology*. 4th ed. vol. 1. Lippincortt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001.

5) **Cahour A, Pletnev A, Vazielle-Falcoz M, Rosen L, Lai CJ:** Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology* **207:** 68-76, 1995.

6) **Chambers TJ, Halm CS, Galler R, Rice CM:** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol*. **44:** 649-688, 1990.

7) **Contreras R, Cherouter H, Degrave W, Fiers W:** Simple, efficient *in vitro* synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res.* **10:** 6353-6362, 1989.

8) **Guirakhoo F, Monath TP:** Immunoginicity, genetic stability, and protectiver efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-japanese encephalitis virus (chimerivax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology* **257:** 363-372, 1999.

9) **Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH:** Conserved elements in the 3untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J. Mol. Biol.* **198:** 33-41, 1987.

10) **Herold J, Andino R:** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* **7:** 581-591, 2001.

11) **Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D:** Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J. Virol.* **21:** 1085-1093, 1977.

12) **Hofacker IL, Fekete M, Flamm C, Huynen MA, Rauscher S, Stolorz PE, Stadler PF:** Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Res.* **26:** 3825-3836, 1998.

13) **Hofacker IL, Fontana W, Stadler PF, Bonhoeffer S, Tacker M, Schuster P:** Fast folding and comparison of RNA secondary structure. *Monatsh. Chem.* **125:** 167-188, 1994.

14) **Hofacker IL, Stadler PF:** Automatic detection of conserved base pairing patterns in RNA virus genomes. *Comput. Chem.* **23:** 401-414, 1999.

15) **Holden KL, Harris E:** Enhancement of dengue virus translation:role of the 3untranslated region and the terminal 3stem-loop domain. *Virology* **329:** 119-133, 2004.

16) **Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P:** Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84:** 8140-8144, 1987.

17) **Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG:** Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J. Virol*. **75:** 6719-6728, 2001.

18) **Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ:** Origin of the west nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United states. *Science* **286:** 2333-2337, 1999.

19) **Lo MK, Tilgner M, Bernard KA, Shi PY:** Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J. Virol.* **77:** 10004-10014, 2003.

20) **Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG:** Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* **245:** 203-215, 1998.

21) **Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX:** Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol*. **78:** 1049-1057, 1997.

22) **Markoff L:** 5- and 3-noncoding regions in flavivirus RNA. Adv. *Virus Res*. **59:** 177-228, 2003.

23) **Rice CM:** Flaviviridae: The viruses and their replication, p.931-960. In B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley (ed), *Fields Virology*, Third ed, vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996.

24) **Solomon T:** Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southest asia. *J. Virol.* **77.5:** 3091-3098, 2003.

25) **Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V:** Pestiviruses, P. 1059-1073. In B.N. Field, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed), *Fields Virology*. Raven Press, New York, N.Y.) 1996.

26) **Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB:** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2:** 135-140, 1998.

27) **Yun SI, Kim SY, Lee YM:** Development and apolication of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J. Virol*. **77. 11:** 6450-6465, 2003.

28) **Yun SI, Kim SY, Choi WY, Nam JH, Ju YR, Park KY, Cho HW, Lee YM:** Molecular characterization of the full-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39. *Virus Res* **96(1-2):** 129-140, 2003.