

수청바이러스의 M, L 분절의 염기서열 및 계통 분석

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교 바이러스병연구소, 병원성바이러스은행

김은주 · 문성실 · 송기준 · 송진원 · 박광숙 · 백락주*

Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of M and L Segment of Soochong Virus

Eun Ju Kim, Sung Sil Moon, Ki-Joon Song, Jin-Won Song, Kwang Sook Park and Luck Ju Baek*

Department of Microbiology, College of Medicine, Institute of Viral Diseases,
Bank for Pathogenic Viruses, Korea University, Seoul 136-705, Korea

Received : February 6, 2007

Accepted : April 27, 2007

Hantaan virus (HTNV) and Seoul virus (SEOV) have mainly been known as the cause of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Korea since HTNV has been isolated from Korean field mouse, *Apodemus agrarius* in 1976 and SEOV has been isolated from *Rattus norvegicus* in 1980. Soochong virus-1, -2, -3, -4 (SOOVs) were isolated from lung tissues of four *Apodemus peninsulae* captured on August 1997 at Mt. Gyeong in Hongcheon-gun, Mt. Gachil, Inje-gun, Gangwon Province, and in September 1998 at Mt. Deogyu, Muju-gun, Jeollabuk Province. *Apodemus peninsulae* is the second-most dominant field rodent species found throughout Korea. To determine phylogenetic analysis of SOOVs, we entirely identified nucleotide sequences of M and L segments. The length of M segment was 3,615 bp and L segment was 6,533 bp. SOOVs were diverged from HTNV by 22.7~23.3% and SEOV by 36.3~37.2%, in M segment. In addition, L segment was diverged from HTNV by 21.8~22.0% and SEOV by 30.3~30.5%. SOOVs sequence compared with Amur virus (AMRV) in M segment showed that SOOVs were different with AMRV about 14.6~16.2% in nucleotide sequences. Neighbor-joining phylogenetic analysis based on entire sequences of the M and L segment indicated that the SOOVs sequences present a separate lineage with HTNV, SEOV and AMRV. SOOVs constituted an individual cluster on the phylogenetic tree and they composed a phylogenetic lineage separately. According to these data, SOOVs could be classified as a new hantavirus.

Key Words: Hantavirus, Soochong virus, *Apodemus peninsulae*

서 론

한타바이러스는 설치류를 숙주로 하고 *Bunyaviridae*에 속하며 L (Large), M (Medium), S (Small)로 이루어진 3개의 분절을 가지는 single-stranded, negative-sense RNA 바이러스이다. S 분절은 nucleocapsid 단백질 (Np), M 분절은 당단백질 (G1과 G2), L 분절은 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)

를 지령한다 (16). 한타바이러스 속 (genus)에 속하는 바이러스들은 구형으로 크기는 80~120 nm이며, 표면에 5~10 nm의 당단백질 돌출부위 (glycoprotein projection)를 가지고 있다 (15). 표면항원인 G1과 G2 당단백질은 중요한 항원결정기로 작용하며, 독성, 중화, 적혈구 응집, 세포융합 등과 같은 중요한 생물학적 특징을 가지는 것으로 알려져 있다 (13, 17,19).

한타바이러스는 유라시아 지역과 유럽 등지에서 발생하는 신증후출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)과 북, 남미에서 발생하는 한타바이러스 폐 증후군 (Hanta-virus pulmonary syndrome, HPS)의 원인 바이러스로 잘 알려

*교신저자: 백락주. 136-705, 서울특별시 성북구 안암동5가 126-1번지, 고려대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: +82-2-920-6168, Fax: +82-2-923-3645,
e-mail: baekmicr@korea.ac.kr

저 있다. 한타바이러스 속은 그 원형인 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)를 숙주로 하는 한타바이러스 (Hantaan virus, HTNV 76-118)가 1976년 처음 분리된 이후 지속적으로 새로운 종들이 발견되었고, 지금까지 약 30여 개의 각기 다른 종들을 포함하는 큰 그룹으로 확대되었다 (4,6~11,14,18,20).

국내에서 발생하는 신증후출혈열 환자들의 발병원인은 약 85% 정도가 한타바이러스의 감염으로 알려져 있고, 약 10% 정도는 서울바이러스 (SEOV)에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직 그 원인이 밝혀지지 않은 신증후출혈열의 지속적인 발병으로 인해 우리나라에 새로운 한타바이러스가 분포하고 있을 것으로 추정되며, 이러한 사실을 바탕으로 국내 제 2우점종으로 알려진 흰넓적다리붉은쥐 (*Apodemus peninsulae*)를 채집하여 혈청학적 분석을 통해서, 지금까지 밝혀져 있는 한타바이러스와는 다른 새로운 바이러스가 있음을 입증하였다 (1). 1997년 강원도 홍천군 계방산의 수청골에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐 (*A. peninsulae* 97-35)의 폐 조직에서 새로운 한타바이러스를 분리하여 수청바이러스 (Soochong virus, SOOV-1)라고 명명하였고 같은 해 강원도 인제군 가칠봉에서 채집된 흰넓적다리붉은쥐 (*A. peninsulae* 97-59)와 1998년 전북 무주군 덕유산에서 채집된 흰넓적다리붉은쥐 (*A. peninsulae* 98-43, *A. peninsulae* 98-50)로

부터 바이러스를 분리하여 각각 SOOV -2, -3, -4라고 명명하였다 (5).

본 연구는 SOOV -1, -2, -3, -4 각각의 M과 L 분절의 전체 염기서열을 결정하고, 다른 한타바이러스들과의 염기 및 아미노산 서열 비교 분석을 통해서 유전학적 차이를 규명하며, 이를 바탕으로 계통수 분석을 실시하여 수청바이러스가 새로운 바이러스임을 입증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 수청바이러스 (Soochong virus, SOOV)

SOOV -1, -2, -3, -4는 모두 -70℃에 분주 보관 중인 종자바이러스를 사용하였다. 세포배양 플라스크에 단층이 되도록 2일간 배양한 Vero E6 cell에 각각 1 ml의 바이러스를 접종하고 1시간 30분 동안 흡착시켰다. 흡착 후, 남아있는 바이러스 부유액을 제거하고, 새로운 배양액을 일정량 첨가해 주었으며 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 상층액은 분주하여 -70℃에 종자바이러스로 보관하였다.

2. Viral RNA의 추출과 RT-PCR

SOOV -1, -2, -3, -4를 각각 접종하여 감염된 세포에서 TRI-

Table 1. Oligonucleotide primers of M segment for PCR amplification

Primer name	Position (bp)	Primer sequence (5'-3')
OSV 146(+)	HTNV : 1~22	5'-TAG TAG TAG ACA CCG CAA AAG A-3'
SCVM(+) 256	SCV1M : 256~278	5'-CAC AAT CAC (G/A)AA GTA CAC TCA (G/A)G-3'
HTM F548(+)	HTNV : 548~564	5'-TAT GAG AGA AGT TAC TGT-3'
SCVM(-) 837	SCV1M : 815~837	5'-GAT CTA AAG TCA TCA AGG GTT GG-3'
SCVM 931(+)	SCV1M : 906~930	5'-TTG CCT CTT CTT ATT CCA TTG TAG GAC C-3'
HTM3(+)	HTNV : 1129~1152	5'-GAT TGA TTT ACC TGG ATA CTA CGA-3'
SCVM(+) 1435	SCV1M : 1410~1434	5'-CTA GCC TGT TTT CAC TTC TTC CTG G-3'
SCVM(-) 1572	SCV1M : 1573~1597	5'-GCT TGT GTG GAA AAT GTT TGC AAT A-3'
HTM4(-)	HTNV : 1671~1694	5'-ACT CAT TCA TGC AGA CAT CAC ATA-3'
G2-1(+)	HTNV : 1970~1990	5'-TGG GCT GCA AGT GCA TCA GAG-3'
SCVM(-) 2095	SCV1M : 2096~2120	5'-GGT TTG TAA GCC TTC TTC GGT AAG T-3'
HTMF(+) F2270	HTNV : 2270~2286	5'-TAC CCT TGG CAT ACT GC-3'
G2-2(-)	HTNV : 2360~2380	5'-ACA TGC TGT ACA GCC TGT GCC-3'
SCVM(+) 2602	SCV1M : 2577~2601	5'-TAT TGT TTT TTG GAC CGT TAG AGG G-3'
SCVM(-) 2665	SCV1M : 2666~2690	5'-GGA AGC CTC TAT CTC TTG GAC TCA T-3'
SCVM(+) 3151	SCV1M : 3126~3150	5'-CTG TTA AAG TCT CAG GGA AAG GAG G-3'
SCVM(-) 3185	SCV1M : 3186~3210	5'-TGA AGA CCA ATT TGT GAG CAC TCT T-3'
HTM2(-)	HTNV : 3594~3616	5'-TAG TAG TAG ACA CCG CAA GAT GT-3'

Table 2. Oligonucleotide primers of L segment for PCR amplification

Primer name	Position (bp)	Primer sequence (5'-3')
SCV2L 5' Terminal(+)	SCV2L : 1~14	5'-TAG TAG TAG ACT CC-3'
SCV2L 5' Terminal(-)	SCV2L : 167~186	5'-GTT GTC AGA CCA GTC ATC CT-3'
SCVL(+) 131	SCV2L : 131~150	5'-TAT GCA GTC AGG CAT GA(T/C) AT-3'
SCVL(-) 1111	SCV2L : 1092~1111	5'-ATT ATG CAC CAA GGA TTC AG-3'
SCL(+) H1012	SCV2L : 1012~1031	5'-TCC AGA CAC ACC AGC ATC AT-3'
SCL(+) H1666	SCV2L : 1665~1685	5'-GGA TAC TAT CTT GCT TGA TGG-3'
SCL(-) H1716	SCV2L : 1695~1714	5'-TAA CTT TGG ATA CCC CCC AC-3'
HTL-F2099	HTNV : 2099~2115	5'-TT(A/G) AC(A/T) GTT GAC CAA TC-3'
HTL-R 2262	HTNV : 2246~2262	5'-TG(A/T/G) ATT TT(A/T) GC(C/T) TCT TC-3'
SCL(-) H2780	SCV2L : 2760~2779	5'-TGG CAT CAT AGT AGT CCT CA-3'
SCL(+) H3012	SCV2L : 2991~3010	5'-TCG GAG ATT TAC TGC TAT GT-3'
SCL(-) 1	SCV2L : 3193~3215	5'-TTA CCT TGC AGC CAA TTT CCT TT-3'
SCL(+) H3690	SCV2L : 3570~3587	5'-AGG TTG TGC TGT TTC GAT CCC A-3'
HTL-F4403	HTNV : 4403~4419	5'-TG(C/T) ACA TTT TCT AAA GA-3'
HTL-R4518	HTNV : 4502~4518	5'-TCT (C/T)T(G/C) ACT GTG AAT GT-3'
SCL(-) H4477	SCV2L : 4476~4500	5'-TCT GCC CAC TTT TGC TCT CTG AAC T-3'
SCL(+) H4875	SCV2L : 4854~4873	5'-AGT TCT CCA GGC AGT GTC GA-3'
SCL(-) 5	SCV2L : 5169~5190	5'-ATT TGC TTT TAC ACC ATC TCC A-3'
SCL(-) H5527	SCV2L : 5503~5525	5'-TGA TTG ATT GCC TGT GTT GTC CT-3'
SCL(+) H5768	SCV2L : 5744~5766	5'-ACC TCC CTG CAG CTA TCC CAC CT-3'
SCL(-) 7	SCV2L : 5930~5949	5'-AAA CTC ATC TCT TCA GAC CA-3'
SCV2L 3' Terminal(+)	SCV2L : 6162~6182	5'-GGT ATC ACG AGG GTT ATC AAT-3'
SCV2L 3' Terminal(+) Nested	SCV2L : 6258~6279	5'-GCA AGT GTC TTT ATT AGA TCC A-3'
HTL-R6533	HTNV : 6516~6533	5'-TAG TAG TA(T/G) (G/A)CT CCG-3'

Table 3. GenBank accession code of Soochong viruses

Virus	Animal serial No.	Virus isolated provinces	GenBank accession No.		
			S-segment	M-segment	L-segment
SOOV-1	A.p 97-35	Gyebang Mt. Hongcheon-country, Gangwon-province, Korea	AY675349	AY675353	DQ056292
SOOV-2	A.p 97-59	Gachil Mt. Inje-country, Gangwon-province, Korea	AY675350	DQ056293	AY675354
SOOV-3	A.p 98-43	Deogyu Mt. Muju-country, Jeollabuk-province, Korea	AY675351	DQ056294	-
SOOV-4	A.p 98-50	Deogyu Mt. Muju-country, Jeollabuk-province, Korea	AY675352	DQ056295	-

- : Sequences were determined completely, but un-published on the GenBank.

Table 4. Percent similarity and divergency based on the nucleotide sequences of M segments

Percent Identity																					
	SOOV -1	SOOV -2	SOOV -3	SOOV -4	AMRV /B78	AMRV /H5	HTNV /76-118	HTNV /84FLi	HTNV /8ao14	HTNV /A9	HTNV /Lee	Hanta /HB55	Hanta /L99	Hanta /Liu	Hanta /Z10	Hanta /Z37	HTNV /CUMC- B11	SEOV /80-39	SAAV	DOBV	
Divergence	SOOV-1	98.6	89.8	87.4	87.0	87.0	80.7	80.6	80.2	79.6	80.3	72.2	72.1	87.0	79.9	72.1	80.7	71.9	70.8	71.6	
	SOOV-2	1.5		90.1	87.3	86.8	87.0	80.7	80.4	80.1	79.8	80.2	72.3	72.2	87.1	80.1	72.3	80.7	72.1	70.9	71.6
	SOOV-3	11.1	10.8		96.9	86.3	86.0	81.1	80.7	80.8	80.1	80.8	72.0	72.1	86.0	80.4	71.9	81.1	72.0	71.5	71.3
	SOOV-4	14.0	14.1	3.2		85.9	85.8	80.6	81.2	80.7	80.5	80.7	72.1	72.1	85.8	80.4	72.0	80.7	71.9	71.4	71.1
	AMRV/B78	14.6	14.9	15.5	15.9		96.5	79.4	80.2	80.1	79.7	79.7	71.6	71.5	96.4	79.2	71.4	79.5	71.4	70.3	70.7
	AMRV/H5	14.7	14.6	15.9	16.2	3.6		79.7	79.8	79.7	79.7	79.7	69.0	69.1	99.9	79.6	71.7	79.6	71.2	70.2	69.8
	HTNV/76-118	23.1	23.1	22.7	23.3	24.8	24.3		84.0	87.8	84.7	95.0	71.9	71.8	79.6	84.2	71.5	99.9	71.8	71.3	71.4
	HTNV/84FLi	22.9	23.5	22.7	22.1	23.4	23.8	18.4		84.6	85.4	84.1	71.4	71.4	80.2	85.2	72.1	84.0	72.1	71.8	72.0
	HTNV/8ao14	23.2	23.4	22.8	22.8	23.4	24.0	13.7	17.6		84.4	87.7	69.0	69.1	79.6	84.8	70.4	87.8	69.9	69.2	71.3
	HTNV/A9	24.6	24.4	23.5	23.0	24.3	24.0	17.6	16.6	18.0		84.2	71.6	71.6	80.0	87.3	71.9	84.7	71.6	70.6	71.1
	HTNV/Lee	23.7	24.0	23.1	23.1	24.4	24.6	5.2	18.3	13.8	18.3		71.7	71.7	79.7	84.0	71.1	95.0	71.7	71.3	71.3
	Hanta/HB55	36.9	36.5	36.4	36.5	37.3	37.6	36.6	38.0	37.0	37.4	37.2		99.5	71.9	71.8	95.8	72.1	95.6	70.6	71.3
	Hanta/L99	36.9	36.6	36.3	36.4	37.3	37.6	36.7	37.9	37.0	37.4	37.1	0.5		71.9	71.9	95.7	72.1	95.5	70.6	71.3
	Hanta/Liu	14.6	14.6	15.9	16.2	3.7	0.1	24.4	23.6	24.0	23.7	24.4	37.3	37.3		79.8	72.1	79.8	71.5	70.7	71.2
	Hanta/Z10	24.0	23.9	23.5	23.6	24.9	24.3	18.2	16.8	17.3	14.3	18.4	37.0	36.9	24.1		71.8	84.1	71.8	70.9	71.0
	Hanta/Z37	36.5	36.3	36.2	36.3	37.6	37.2	37.3	36.8	37.4	36.8	37.9	4.3	4.4	36.9	37.0		71.7	96.1	70.7	71.6
	HTNV /CUMC-B11	23.2	23.2	22.7	23.3	24.7	24.6	0.1	18.4	13.7	17.6	5.2	36.6	36.7	24.5	18.3	37.3		72.0	71.5	71.5
	SEOV/80-39	37.2	36.7	36.3	36.6	37.8	38.2	36.5	36.6	37.0	37.1	37.0	4.6	4.7	37.8	37.1	4.1	36.5		70.9	71.6
	SAAV	39.3	39.3	38.5	38.6	40.3	40.3	37.9	38.6	38.9	38.7	38.3	40.1	40.0	40.1	39.4	40.0	37.9	39.3		82.4
	DOBV	38.2	38.4	37.9	38.5	39.7	39.1	37.6	37.1	38.1	38.7	38.0	39.4	39.4	39.0	39.1	38.9	37.5	38.6	20.8	

김민서, 김정은, 송기찬, 송진영, 박영혜, 박라라

Table 5. Percent similarity and divergency based on the nucleotide sequences of L segments

Percent Identity																							
	SOOV -1	SOOV -2	SOOV -3	SOOV -4	HTNV /76-118	HTNV /84FLi	Hanta /A9	Hanta /L99	Hanta /Z10	Hanta /Z37	SEOV /80-39	SAAV	DOBV	PUUV /sotkamo	PUUV /CG1820	PUUV /Umea- hu	TULV	SNV /NMH -10	SNV /NMR -11	ANDV /Chile- 9717869	ANDV /CHI- 7913	CCV	
Divergence	SOOV-1		98.6	86.3	86.1	81.4	81.8	81.2	75.2	81.5	75.3	75.5	75.0	75.0	68.4	68.5	67.7	68.1	67.8	67.7	67.6	67.8	67.6
	SOOV-2	1.4		86.2	86.0	81.3	81.7	81.2	75.5	81.4	75.5	75.7	75.0	75.1	68.3	68.5	67.4	68.3	67.7	67.7	67.6	67.6	67.6
	SOOV-3	15.4	15.6		99.6	81.2	81.4	80.8	75.3	81.1	75.3	75.5	74.9	75.5	68.5	68.1	67.0	67.8	67.7	67.7	67.1	67.7	67.3
	SOOV-4	15.8	15.9	0.4		81.2	81.2	80.7	75.3	81.1	75.3	75.4	74.9	75.5	68.4	68.1	66.9	67.8	67.7	67.7	67.0	67.7	67.3
	HTNV /76-118	21.8	21.9	22.0	22.1		83.7	83.8	74.4	83.7	74.5	74.7	74.6	74.9	67.9	68.0	67.6	67.5	67.6	67.6	67.4	67.8	67.5
	HTNV /84FLi	21.2	21.4	21.8	22.0	18.8		97.9	75.8	86.4	75.5	75.7	74.9	75.0	68.6	68.3	67.1	67.9	67.7	67.7	67.6	67.3	67.6
	Hanta/A9	22.1	22.1	22.6	22.7	18.7	2.2		75.1	85.6	74.8	75.1	74.6	74.8	68.5	68.0	66.8	67.7	67.5	67.5	67.3	67.1	67.5
	Hanta/L99	31.1	30.7	30.7	30.7	32.3	30.1	31.1		75.5	95.7	95.9	75.1	75.3	68.7	67.6	67.3	67.7	67.9	67.9	67.3	67.7	68.1
	Hanta/Z10	21.7	21.8	22.2	22.3	18.9	15.4	16.5	30.6		74.8	75.0	75.1	75.2	68.3	67.9	67.5	67.9	67.6	67.6	67.8	67.6	67.5
	Hanta/Z37	30.8	30.6	30.5	30.5	32.0	30.3	31.3	4.4	31.3		96.2	74.9	75.4	68.7	68.0	67.4	67.9	67.7	67.7	67.5	67.8	68.1
	SEOV /80-39	30.6	30.4	30.3	30.4	31.9	30.2	31.2	4.3	31.0	3.9		74.9	75.4	68.5	67.8	67.5	67.6	67.8	67.8	67.0	67.5	67.9
	SAAV	31.2	31.2	31.2	31.3	31.6	31.5	31.9	31.0	31.1	31.4	31.4		85.7	68.1	68.6	67.6	67.4	67.2	67.3	67.3	67.0	68.1
	DOBV	31.1	31.0	30.5	30.6	31.1	31.0	31.4	30.9	30.8	30.6	30.7	16.3		68.5	68.2	68.1	67.9	68.2	68.2	67.9	67.5	67.3
	PUUV /sotkamo	44.9	45.1	44.9	45.0	45.3	44.4	45.0	44.5	44.8	44.4	44.3	44.8	44.3		84.6	82.4	75.6	71.8	71.8	71.9	71.9	72.7
	PUUV /CG1820	45.1	45.2	45.3	45.3	45.1	44.9	46.0	45.8	45.7	44.9	45.3	44.7	44.9	17.6		81.7	75.3	71.5	71.5	71.2	71.4	71.4
	PUUV /Umea-hu	45.4	45.7	47.2	47.2	45.8	45.8	47.0	47.1	46.5	46.4	46.5	45.5	44.2	20.3	21.3		74.7	71.0	71.0	71.4	71.0	71.1
	TULV	44.7	44.5	45.8	45.9	46.7	45.1	46.0	45.6	46.0	45.4	45.6	46.4	45.2	30.5	30.8	31.5		71.9	71.9	72.2	71.8	72.0
	SNV /NMH10	45.6	45.8	45.6	45.7	45.9	45.2	45.6	44.6	45.5	44.4	44.7	45.5	44.2	36.8	37.0	38.3	36.1		100.0	75.6	75.4	88.0
	SNV /NMR11	45.6	45.9	45.6	45.7	45.9	45.3	45.7	44.6	45.5	44.5	44.7	45.5	44.2	36.8	37.1	38.3	36.1	0.0		75.6	75.4	88.0
	ANDV /Chile- 9717869	45.1	45.1	46.7	46.8	45.5	45.1	45.9	45.7	45.4	45.4	45.6	45.7	45.1	36.0	36.7	37.2	46.2	30.3	30.3		93.9	74.9
	ANDV /CHI-7913	46.0	46.2	46.4	46.4	45.8	45.8	46.6	45.8	45.5	45.6	45.9	46.5	45.8	36.2	37.0	37.8	36.4	30.5	30.5	6.4		75.3
	CCV	45.7	45.5	46.2	46.3	45.4	44.9	45.1	43.8	45.4	43.8	44.0	45.0	45.6	35.1	37.1	37.6	36.1	13.5	13.4	31.1	30.5	

bee (TEL-Test, Friendswood, TX, USA)를 사용하여 manual 법으로 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 50℃에서 10분간 완전히 녹인 후 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다. 감염된 세포로부터 추출한 viral RNA와 MMLV reverse-transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), random hexamer, 그리고 각각의 forward primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 10 µl viral RNA와 1 µl (10 pmol/ml) specific primer, 1 µl (10 pmol/ml) random hexamer를 넣고 70℃에서 10분간 반응시킨 후, 1 µl 10 mM dNTP (Finezyme, Espoo, Finland), 4 µl 5X RTase buffer (Promega), 0.5 µl M-MLV RTase (Promega), 0.5 µl RNase inhibitor (Fermentas, Hanover, MD, USA)에 2 µl RNase free water를 첨가하여 총 20 µl가 되도록 만든 후, 37℃에서 10분, 42℃에서 50분, 94℃에서 3분 동안 Peltier thermal cycler PTC-200 (MJ Research Inc, Reno, NV, USA)에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다.

3. PCR

SOOV -1, -2, -3, -4 각각의 M, L 분절 염기서열을 분석하기 위해서 한타바이러스의 conserved sequence를 이용하여 primer를 제작하였다 (Table 1, 2). 2.5 µl cDNA, 1 µl (10 pmol/ml) forward primer, 1 µl (10 pmol/ml) reverse primer, 5 µl 10X PCR buffer (Takara, Gyeonggi-Do, Korea), 1 unit Ex-Taq polymerase (Takara), 4 µl 2.5 mM dNTP (Takara)를 섞어주고 총량이 50 µl가 되도록 멸균한 증류수를 첨가해 주었다. PCR 반응은 각각의 Tm값과 증폭되는 길이에 따라서 조금씩 차이를 두었다. 일반적으로 사용한 방법은 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 95℃ 30초~1분, annealing temperature에서 40~50초, 72℃ 1~3분을 30~35 cycle로 반복 시행하였고, 72℃ 7분간 반응시켰다.

4. 염기서열의 결정

증폭된 PCR 산물은 gel loading 후 power gel extraction kit (Takara)을 사용하여 정제하고, pSTblue-1 acceptor vector (Novagen, Madison, WI, USA)에 클로닝하였다. Enzyme digestion 후 선별된 plasmid들은 Dye deoxy terminator cycle method를 사용하여 염기서열을 확인하였고, EditSeq (DNA STAR Inc. Madison, WI, USA)와 SeqMan (DNA STAR Inc.), MegAlign (DNA STAR Inc.)의 Clustal W method를 사용하여 각각의 염기서열을 결정하였다.

5. 염기서열 및 계통분석

SOOV -1, -2, -3, -4의 M과 L 분절의 전체 염기서열 및 아미노산 서열을 다른 한타바이러스와 비교 분석하기 위해, GenBank에 등록되어 있는 M 및 L 분절의 염기서열을 사

용하였다. SOOV의 M 분절은 등줄쥐 속에서 유래하였거나, 한국, 중국 및 러시아 근접 지역에서 유래된 한타바이러스들 전체 M 분절의 유전정보를 이용하여 비교 분석하였다. L 분절 경우는 전체 L 분절의 염기서열이 GenBank에 등록되어 있는 한타바이러스가 적어서 등록되어 있는 모든 염기서열을 이용하여 계통수 분석을 실시하였다. 또한 SOOV와 다른 한타바이러스들과의 M 및 L 분절 계통수 작성은 PAUP 4.0. (Sinauer Associates, Inc. Version 4.0b10)의 Neighbor-joining (NJ) 방법을 사용하여 실시하였고, 계통 수는 Tree-ViewTM 프로그램을 사용하여 작성하였다.

결 과

1. SOOV의 M, L 분절 염기서열 및 아미노산 서열 결정

SOOV -1, -2, -3, -4 M 분절은 3,615개의 염기서열과 1,136개의 아미노산 서열을 결정하였고, L 분절은 6,533개의 염기서열과 2,152개의 아미노산 서열을 결정하여 GenBank에 등록하였다 (Table 3).

2. SOOV의 M, L 분절의 염기서열 분석

SOOV 각각은 M 분절에서 87.3~98.6%의 상동성을 나타내었다. 등줄쥐 속에서 유래하거나 한국, 중국 및 러시아 근접 지역에서 분리된 다른 한타바이러스들의 M 분절과 비교한 결과, HTNV의 원형으로 알려진 한국 등줄쥐 분리주인 HTNV 76-118과는 22.7~23.3%의 차이를 나타내었고, SEOV 80-39와는 36.3~37.2%로 염기서열 상의 차이가 많은 것으로 확인되었다 (Table 4). 중국의 등줄쥐에서 분리된 것으로 알려진 HTNV A9 및 Bao14와도 22.8~24.6%의 차이를 보였으며, 중국에서 분리된 84FLi, HB55, L99, Z10, Z37 등과도 22.1% 이상의 차이를 보였다. 흰넓적다리붉은쥐로 SOOV와 동일 숙주를 사용한다고 알려진 아무르바이러스 (Amur virus, AMRV)의 M 분절의 염기서열을 비교 분석한 결과 14.6~16.2%로 비교한 한타바이러스들 중에서 비교적 적은 차이를 보임을 알 수 있었다.

M 분절에 비해서 상대적으로 염기서열의 변화가 적다고 알려진 L 분절의 염기서열 분석 결과, SOOV -1, -2, -3, -4의 L 분절에서 각각 86.0~99.6%의 높은 상동성을 나타내었다 (Table 5). 한타바이러스의 원형인 HTNV 76-118과는 21.8~22.1%의 차이를 보였고, SEOV와도 30.3~30.6%로 비교적 높은 차이를 보였다. 또한, 중국의 등줄쥐에서 분리된 HTNV A9과는 22.1~22.7%, 중국에서 유래한 것으로 알려진 HTNV Z10, Z37, L99와도 21.7% 이상의 차이를 보였다. 그러나 SOOV M 분절 비교 분석에서 가장 높은 상동성을 보여주었던 AMRV는 L 분절 염기서열의 정보가 아직 GenBank에 등

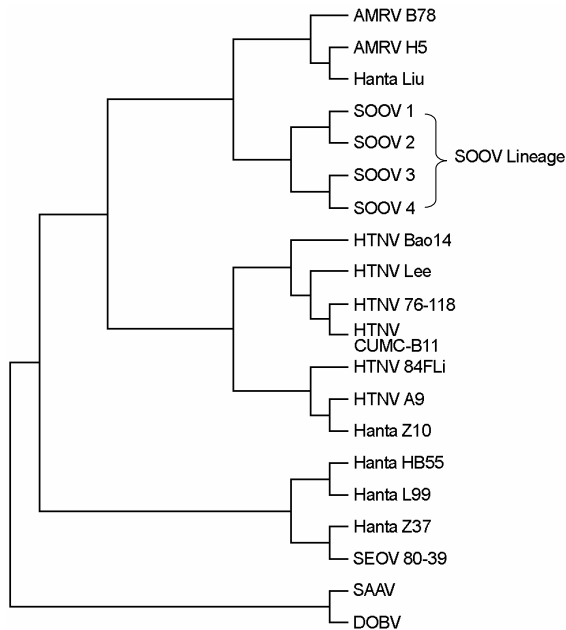


Figure 1. Phylogenetic tree of the hantavirus entire M segments. (AMRV: amur virus, SOOV: soochong virus, HTNV: hantaan virus, SEOV: seoul virus, SAAV: saaremaa virus, DOBV: dobrava virus)

록이 되어 있지 않아서 비교해 볼 수 없었다.

3. SOOV M, L 분절의 계통 분석

M 및 L 분절의 염기서열을 토대로 PAUP법을 이용하여 계통수를 작성하였다 (Fig. 1, 2). M 분절의 계통수 상에서 SOOV가 HTNV 및 SEOV와 다른 계통의 그룹을 형성하였고, 중국 등줄쥐에서 분리된 HTNV Bao14는 한국에서 분리된 HTNV 76-118, Lee, CUMC-B11과 같은 계통 그룹을 형성하였다. SOOV는 염기서열 및 아미노산 서열에서 가장 적은 차이를 보였던 AMRV와 별개의 단독 그룹을 형성하며, HTNV 및 AMRV와는 다른 독자적인 계통 그룹으로 구분되었다. M 분절에 비해서 유전정보가 부족했던 L 분절의 계통수 분석에서 역시 HTNV와는 다른 그룹을 형성하였고, SOOV는 단독의 그룹을 형성하였다.

고 찰

SOOV와 흰넓적다리붉은쥐에 대한 연구는 1997년에 처음 보고되었으며, 1997년에는 채집한 흰넓적다리붉은쥐에서 바이러스를 분리하였고 지역명을 따서 "수청바이러스"라고 명명하였다. 2000년 윤 등에 의해 SOOV의 부분적인 S 분절 및 M 분절의 염기서열 분석을 통한 계통 분석이 이루어졌고, 계통 분석을 통해 SOOV와 HTNV의 상이함을 확인하였다 (2). 2003년에는 정 등에 의해 플랙스감소중화항체법

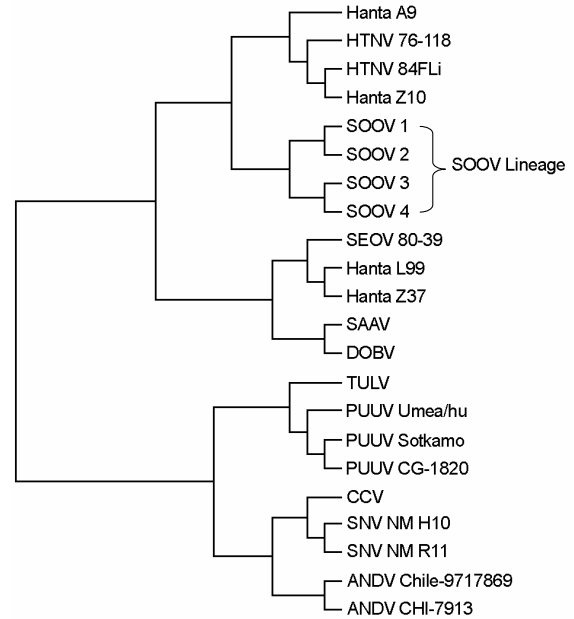


Figure 2. Phylogenetic tree of the hantavirus entire L segments. (AMRV: amur virus, SOOV: soochong virus, HTNV: hantaan virus, SEOV: seoul virus, SAAV: saaremaa virus, DOBV: dobrava virus, TULV: tula virus, PUUV: puumala virus, CCV: creek canal virus, SNV: sin nombre virus, ANDV: andes virus)

(PRNT)을 통한 SOOV의 혈청학적 연구가 수행되었고, SOOV의 중화항체가 HTNV, SEOV, 푸말라바이러스 (PUUV), 프로스펙트바이러스 (PHV)에 대해 4배 이상의 차이를 보이며 새로운 혈청형을 지님을 보고하였다 (3).

SOOV의 M과 L 분절 염기서열 결정을 통해서 SOOVs의 염기서열 상의 상동성에 대해서 알아 본 결과, 강원도 지역에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐에서 분리된 SOOV -1, -2, 전라북도 지역에서 채집한 흰넓적다리붉은쥐에서 분리된 SOOV -3, -4에서 높은 상동성을 보였다. 이미 선행된 S 분절의 염기서열 분석 결과에서 SOOV -1, -2에서 98.4%, SOOV -3, -4에서 99.5%의 높은 상동성을 보인 바 있으며, 지역적인 차이에 따라 두 그룹으로 나뉘는 것을 알 수 있었다. 한국에서 신증후출혈열을 일으키는 것으로 알려진 HTNV와 SEOUV의 염기서열을 SOOV의 염기서열과 비교 분석한 결과, 항원성을 나타내는 M 분절의 염기서열 상에서 SOOV와 HTNV는 22.7~23.3%, SOOV와 SEOV는 36.3~37.2%의 차이를 보였는데, 이러한 결과는 SOOV가 유전적으로 HTNV 및 SEOV와는 다른 새로운 유전형질을 보인다는 것을 시사한다.

등줄쥐 속에서 유래하거나 한국, 중국 및 러시아 근접 지역에서 유래된 한타바이러스들과 계통발생학적으로 어떤 차이를 보이는 지에 대해서 알아보기 위해서 계통 분석을 실시한 결과, SOOV가 HTNV와 다른 독자적인 그룹을 형성하였고, 중국지역에서 환자로부터 분리된 AMRV H5와 B78, 그

리고 중국 상동 지역의 환자에서부터 분리된 중국 분리주 Liu와도 다른 계통의 그룹을 형성함을 알 수 있었다. SOOV와 AMRV의 염기서열을 비교해 본 결과, S 분절에서는 8.5~13.5%, M 분절에서는 14.6~16.2%의 차이를 보였는데, HTNV와 비교했을 때 보다 염기서열 상의 차이가 적은 것을 알 수 있었다. 이런 결과는 SOOV와 AMRV가 모두 흰넓적다리붉은쥐를 숙주로 사용하여 계통발생학적으로 근접한 위치에 있기 때문으로 생각된다. 지금까지의 결과를 바탕으로 SOOV가 HTNV, SEOV 및 AMRV와 유전학적으로 다르고 국내 흰넓적다리붉은쥐를 숙주로 하는 새로운 유전형의 한타바이러스임을 증명하였다.

참 고 문 헌

- 1) 백락주, 강주일, 송기준, 송진원, 양병국, 이용주: 1995년 계방산에서 채집한 들쥐의 한타바이러스 감염에 대한 혈청학적 연구. *대한바이러스학회지* **27(2)**: 177-183, 1997.
- 2) 송기준, 윤형선, 고은영, 정기모, 박광숙, 이용주, 송진원, 백락주: Isolation of *Apodemus peninsulae*-borne Hantaan virus and comparison of molecular biological characteristics. *대한바이러스학회지* **30권 1호**: 19-28, 2000.
- 3) 정수용, 송기준, 송진원, 문성실, 김은주, 박광숙, 기선호, 백락주: 신종 수청바이러스와 무주바이러스의 혈청학적 특성. *대한바이러스학회지* **35(3)**: 249-225, 2005.
- 4) Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, van der Groen G, LeDuc JW: Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* **38**: 132-137, 1992.
- 5) Baek LJ, Kariwa H, Lokugamage K, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Kang JI, Moon SS, Chung SY, Kim EJ, Kang HJ, Song KJ, Klein TA, Yanagihara R, Song JW: Soochong virus: An antigenically and genetically distinct hantavirus isolated from *Apodemus peninsulae* in Korea. *J Med Virol* **78(2)**: 290-297, 2006.
- 6) Elliott LH, Ksiazek TG, Rollin PE, Spiropoulou CF, Morzunov S, Monroe M, Goldsmith CS, Humphrey CD, Zaki SR, Krebs JW, et al: Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 102-108, 1994.
- 7) Hughes AL, Friedman R: Evolutionary diversification of protein-coding genes of hantaviruses. *Mol Biol Evol* **17**: 1558-1568, 2000.
- 8) Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis* **146**: 638-644, 1982.
- 9) Lee PW, Amyx HL, Gajdusek DC, Yanagihara RT, Goldgaber D, Gibbs CJ, Jr: New hemorrhagic fever with renal syndrome-related virus in rodents in the United States. *Lancet* **2**: 1405, 1982.
- 10) Lopez N, Padula P, Rossi C, Miguel S, Edelstein A, Ramirez E, Franze-Fernandez MT: Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res* **50**: 77-84, 1997.
- 11) Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Lahdevirta J: Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* **141**: 131-134, 1980.
- 12) Nowak RM: Walker's mammals of the world. Baltimore: Johns Hopkins University: 1499, 1999.
- 13) Ogino M, Yoshimatsu K, Ebihara H, Araki K, Lee BH, Okumura M, Arikawa J: Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins. *J Virol* **78**: 10776-10782, 2004.
- 14) Rollin PE, Ksiazek TG, Elliott LH, Ravkov EV, Martin ML, Morzunov S, Livingstone W, Monroe M, Glass G, Ruo S, et al: Isolation of black creek canal virus, a new hantavirus from *Sigmodon hispidus* in Florida. *J Med Virol* **46**: 35-39, 1995.
- 15) Schmalhohn CS: Bunyaviridae: The Virus and Their Replication. Fields virology, Third Edition: 1447-1472, 1996.
- 16) Schmaljohn CS, Dalrymple JM: Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology* **131**: 482-491, 1983.
- 17) Shi X, Elliott RM: Golgi localization of Hantaan virus glycoproteins requires coexpression of G1 and G2. *Virology* **300**: 31-38, 2002.
- 18) Song JW, Baek LJ, Gajdusek DC, Yanagihara R, Gavrilovskaya I, Luft BJ, Mackow ER, Hjelle B: Isolation of pathogenic hantavirus from white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Lancet* **344**: 1637, 1994.
- 19) Song JW, Song KJ, Baek LJ, Frost B, Poncz M, Park K: In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Exp Mol Med* **37**: 121-127, 2005.
- 20) Yashina L, Mishin V, Zdanovskaya N, Schmaljohn C, Ivanov L: A newly discovered variant of a hantavirus in *Apodemus peninsulae*, far Eastern Russia. *Emerg Infect Dis* **7**: 912-913, 2001.