

돼지생식기호흡기증후군 바이러스의 RNA 자가복제에 필수적인 5' 및 3' 시스-작용 RNA 인자

충북대학교 수의과대학 동물의학연구소¹, 충북대학교 의과대학 미생물학교실, 의학연구소²

강신영¹ · 최유정² · 윤상임² · 송병학² · 이영민^{2*}

5' and 3' *cis*-Acting RNA Elements Required for RNA Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Shien-Young Kang¹, Yu-Jeong Choi², Sang-Im Yun², Byung-Hak Song² and Young-Min Lee^{2*}

¹Research Institute of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea

²Department of Microbiology, College of Medicine and Medical Research Institute,
Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea

Received : August 22, 2007

Accepted : September 13, 2007

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), a member of the genus *Arterivirus* in the family *Arteriviridae*, is the most important viral pathogens in swine industry worldwide. Here, we have investigated 5' and 3' *cis*-acting RNA elements required for PRRSV genome replication. Using the infectious PRRSV cDNA, we have manipulated the genomic RNA to generate mutant genomic RNAs, transfected these mutants into susceptible MARC-145 cells, and examined the competence of RNA replication. We found three genetic factors that were essential for viral replication. First, the cap structure present at the 5'-end of the genome was absolutely required for RNA replication. Secondly, polyadenylation of the genomic RNA at the 3'-end was also essential for RNA replication. Thirdly, approximately 100-nucleotide region just upstream of the N protein-coding region was crucial for genomic RNA replication. Taken together, our findings indicate that replication of PRRSV genomic RNA requires three important *cis*-acting RNA elements: 5' cap structure, 3' poly(A) motif, and an internal sequence of about 100 nucleotides. Further investigation is needed to elucidate the molecular mechanism(s) of how these elements act on PRRSV genome replication.

Key Words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; Arterivirus; RNA replication; *cis*-acting elements

서 론

돼지생식기호흡기증후군 (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS)는 1987년 미국에서 처음으로

인지되었으며, 이어서 캐나다로 급속히 전파되었다 (7). 유럽에서는 1990년 독일에서 최초로 발병하였으며, 이어서 네덜란드, 스페인, 영국, 및 덴마크로 전파되었다 (32, 33). 현재 이 질병을 일으키는 바이러스로 밝혀진 PRRSV 감염은 아시아, 유럽, 및 북미와 남미를 포함한 전 세계의 거의 모든 지역에서 발견할 수 있다. 유전학적으로 PRRSV는 크게 2개의 유전형 (genotype)으로 분류된다. Lelystad을 포함하는 유럽주 (33)와 VR-2332을 포함하는 북미주 (2,7). 이 두 유전형에 포함되는 바이러스들 사이에는 약 50~70% 정도의 매우 낮은 염기서열 상동성을

*교신저자: 이영민. 361-763, 충북 청주시 개신동 12번지,
충북대학교 의과대학 미생물학교실, 의학연구소
Phone: +82-43-261-2863, Fax: +82-43-272-1603,
e-mail: ymlee@chungbuk.ac.kr

**본 연구는 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-042-E00132).

나타낸다 (10,14,16~18,20,21,23). 분류학적으로 PRRSV는 equine arteritis virus (EAV), lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV), simian hemorrhagic fever virus (SHFV)를 포함하는 *Arterivirus* genus (속), *Arteriviridae* family (과)에 속한다 (4,29).

PRRSV는 작은 엔벨롭바이러스 (enveloped virus)이며, 바이러스의 게놈은 단일가닥의 양성-극성 RNA이다. 다른 arterivirus와 마찬가지로, PRRSV 게놈은 약 15 kb 정도이며, nucleocapsid 단백질 내에 싸여져 있다 (7). 게놈의 5'-말단에는 타입 I 캡 구조 (type I cap structure)를 가지고 있으며, 3'-말단에는 poly(A) tail를 가지고 있다 (25). PRRSV의 경우, 현재까지 약 20여 개의 분리주의 전체-게놈의 염기서열이 밝혀져 있다 (5). 바이러스의 자가복제에 필요한 효소들로 구성되어진 것으로 믿어지는 비구조단백질 (nonstructural protein)들은 바이러스 게놈의 5'-말단으로부터 대략 4/5를 차지하며, 서로 중첩되는 ORF1a와 ORF1b에 의해서 만들어진다. ORF1b 유전자의 경우는 ribosomal frameshift에 의해서 발현된다 (3). 바이러스의 구조단백질 (structural protein)들은 게놈의 3'-말단으로부터 약 1/5를 차지하며, ORF2a, ORF2b에서부터 ORF7까지 7개의 유전자로부터 발현된다. ORF2b는 ORF2a 내에 완전히 중첩되어 있다. 이들 바이러스 단백질들은 감염된 세포 내에서 subgenomic mRNA의 5'-말단으로부터 발현된다 (19,30). 최근 PRRSV의 역상유전자 시스템 (reverse genetics system)이 3이상의 독립된 연구그룹으로부터 개발되었으므로, 앞으로 이들의 기능 및 분자생물학적 특성에 대한 연구에 많은 진전이 있을 것으로 기대된다.

본 연구논문에서는 PRRSV가 세포에 감염된 후, 이들의 전체-게놈 RNA가 복제되는 데에 필요한 *cis*-acting RNA elements에 대해서 알아보려고 하였다. 최근 국내에서 감염된 돼지로부터 분리된 PRRSV의 국내분리주 PL97-1/LP1에 대한 분자생물학적 특성이 분석되었으며, 또한 이를 주형으로 사용하여 infectious cDNA molecular clone이 합성되었다 (5,13). 본 연구에서는 이 infectious PRRSV cDNA를 사용하여 PRRSV의 게놈 RNA를 유전학적으로 조작함으로써, PRRSV genome replication에 절대적으로 필요한 5' 및 3' *cis*-acting RNA elements를 동정하였다. 이들은 PRRSV에 민감성을 나타내는 MARC-145 세포에 바이러스의 자가복제에 절대적으로 필요하다는 것을 알 수 있었다. 이들 3개의 *cis*-acting elements 중에서,

특히 PRRSV N 유전자 바로 앞부위에 중요한 *cis*-acting element가 자리잡고 있다는 것을 발견하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

MARC-145 세포는 minimal essential medium (MEM) 배지에 5% 우태아혈청 (fetal bovine serum)과 nonessential amino acids, sodium pyruvate, 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 완전한 배양액으로 사용하였다. MARC-145 세포는 37°C, 5% CO₂에서 배양하였으며, 3~4일 마다 계대 배양함으로써 유지하였다. 세포배양시 사용한 모든 재료들은 GIBCO-Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA)으로부터 구입하였다.

2. 플라스미드 제작

본 실험에서는 일반적인 분자생물학적 실험기법을 사용하여 모든 플라스미드를 제작하였다 (26). 본 연구논문에서 재조합된 모든 PRRSV mutant cDNA들은 PRRSV 국내분리주 PL97-1/LP1 (GenBank Accession No. AY612613)으로부터 합성된 infectious PRRSV cDNA, pBAC/PRRSV/FL/AclI^{MBN} (5)를 주형으로 사용하여 제작하였다. 클로닝된 재조합 PRRSV mutant cDNA 플라스미드는 CsCl density gradient에 의해서 순수 분리되었다. 모든 연구에서 제작된 돌연변이들은 PCR를 통해서 infectious cDNA에 삽입하였다. PCR로 증폭된 부위는 염기서열 분석을 통해서 원하는 돌연변이가 엔지니어링되었는지를 확인하였으며, restriction digestion analysis를 통해서 각각의 재조합 PRRSV mutant cDNA 플라스미드의 구조학적인 분석을 심도있게 실시하였다. Mutagenesis에 사용된 올리고 뉴클레오타이드는 Table 1에 요약하였다.

본 실험에 사용된 infectious PRRSV cDNA에 클로닝된 전체-게놈에 존재하는 poly(A) tail의 길이는 58개인 것을 사용하였다. 이 58개의 poly(A)를 모두 제거한 Mutant/NPA를 제작하기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, PRRSV 게놈의 3'-말단 부위에 해당하는 2765-nucleotide 단편을 PR-F와 PRnpa-R 프라이머를 사용하여 pBAC/PRRSV/FL/AclI^{MBN}을 주형으로부터 PCR 증폭하였다. PCR amplicon으로부터 절단된 2713-nucleotide *Bsr*G I-Not I 단편을 pBAC/PRRSV/FL/AclI^{MBN}으로부터 절단된 2개의 단편 (7603-nucleotide Not I-Pac I 단편과 12843-

Table 1. Oligonucleotides used for mutagenesis in this study.

Oligo-nucleotides	Sequence ^a	Polarity
PR-F	5'-TCCCGGCCAAAGCTTCATGATTTT	sense
PRnpa-R	5'-AGGGCGGCCGCAACGCTCTAGAAATTCGGCCGCATGGTT	antisense
PR14600-F	5'-GCAGACGCGTGGAGCAGTAGTTGCACTCCTTTTG	sense
PR14700-F	5'-GCAGACGCGTTTCTGGCCCCTGCCACACGTTG	sense
PR14800-F	5'-GCAGACGCGTGGTCAACGGCACATTGGTGCCCGG	sense
PR14900-F	5'-GCAGACGCGTCAACGGCAAGCAGCAGAAGAGAAA	sense
PR-R	5'-CCTGCAGGGCGGCCGCAACGTTTTTTTTTTTTT	antisense

^aRestriction endonuclease recognition sites used for cDNA cloning are underlined

nucleotide *Pac* I-*Bsr* G I 단편)과 접합시켰다. 이렇게 만들어진 재조합 PRRSV cDNA 플라스미드는 Mutant/NPA라고 명명하였다.

지난 연구에서 우리들은 PRRSV 게놈 RNA의 3'-말단으로부터 911 뉴클레오타이드가 바이러스의 자가복제에 결정적인 유전인자로 작용한다는 것을 알 수 있었다 (5). 본 연구에서는 911 뉴클레오타이드 중에서 어떠한 염기서열이 바이러스의 자가복제에 중요한 역할을 하는지를 보다 심도있게 분석하기 위해서 5개의 재조합 cDNA (Mutant/nt14500, Mutant/nt14600, Mutant/nt14700, Mutant/nt14800, Mutant/nt14900)를 합성하였다. Mutant/nt14500는 기존에 수행된 연구에서 합성된 pBAC/PRRSV/Repluc S8과 동일하나, 단지 논의의 편의를 위해서 본 연구논문에서 Mutant/nt14500라 명명하였다. 본 실험에서 사용된 Mutant/nt14500는 PRRSV의 염기서열이 결절된 (deleted) 부위에 encephalomyocarditis virus (EMCV)의 internal ribosome entry site (IRES)로부터 발현되는 루시퍼레이즈 유전자를 삽입하여, 바이러스의 자가복제를 효소활성의 정도로 쉽게 분석할 수 있게 하였다. Mutant/nt14600 플라스미드를 제조하기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, PR14600-F와 PR-R 프라이머를 사용하여 pBAC/PRRSV/FL/AclI^{MBN}을 주형으로부터 해당 단편을 PCR 증폭하였다. 증폭된 단편으로부터 886-nucleotide *Mlu* I-*Not* I 단편을 절단하여, Mutant/nt14500으로부터 절단된 2개의 단편 (17584-nucleotide *Not* I-*Rsr* II 단편과 4642-nucleotide *Rsr* II-*Mlu* I 단편)과 접합함으로써, Mutant/nt14600 플라스미드를 제작하였다. 이와 같은 방법으로 Mutant/nt14700, Mutant/nt14800, 그리고 Mutant/nt14900 플라스미드를 제작하였다. 이때 사용된 각각의 프라이머의 쌍은 다음과 같다: Mutant/nt14700, PR14700-F/PR-R; Mutant/

nt14800, PR14800-F/PR-R; Mutant/nt14900, PR14900-F/PR-R.

3. PCR 증폭

PCR 반응은 10 mM Tris, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 200 μM dNTPs, 0.4 μM primers, 2.5 unit Pyrobest polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 포함하는 100 μl 반응액에서 이루어졌다. PCR 증폭은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), extension (72°C, 5분)으로 총 30 cycle을 실행하였으며, 마지막 extension 단계는 72°C에서 10분 동안 진행하였다.

4. 시험관 내 전사반응 (*In vitro* transcription reaction)

1~2 μg의 cDNA 플라스미드를 *Acl* I 또는 *Xba* I (Mutant/NPA의 경우)으로 처리하여 절단함으로써, 시험관 내 전사반응시 필요한 run-off site를 만들었다. 그 이후, 제한효소 반응액은 phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol로 침전시킨 후, 20 μl nuclease-free dH₂O에 녹임으로써 RNase-free DNA 주형을 준비하였다. 전사는 7.5 mM dNTPs, T7 RNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 등이 들어있는 20 μl 반응액을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이렇게 생성된 synthetic RNA는 2.5 M LiCl를 사용하여 -20°C에서 1시간 동안 침전시키고, 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 분리된 RNA는 20 μl nuclease-free dH₂O에 녹여서 준비하여 필요할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

5. RNA 형질전환 (RNA transfection) 및 특이적 감염도 (specific infectivity) 측정

BHK 세포 (1×10⁷)에 시험관 내 전사반응으로 얻어진 synthetic RNA를 형질전환하였다. 형질전환된 세포는 세

포배양액과 섞은 다음, 10배씩 희석된 세포들을 6-well plate의 각각의 well에 넣어서 배양하였다. 이때, 6-well plate에는 이미 1~2시간 전에 3×10^5 의 MARC-145 세포가 각각의 well에 미리 준비되어 있다. 배양을 시작한지 4~6시간이 지나서 0.5% 아가로오스와 10% 우태아 혈청이 들어있는 배지로 덮어서 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 72시간이 경과한 다음, 바이러스의 복제로 인한 plaque를 가시적으로 확인하기 위해서 7.5% 포르말데하이드 고정액으로 고정시킨 후, 5% crystal violet으로 염색하였다. BHK 세포는 다른 세포에 비해서 RNA 형질전환 효율이 높으므로 본 실험에서와 같이 감염성이 낮은 mutant에 대한 분석이 비교적 용이하다. 본 실험은 2번 이상 반복하였으며, 같은 실험결과를 얻었다.

6. 루시퍼레이즈 활성도 (luciferase activity) 측정

PRRSV의 RNA 자가복제로 인해서 유도되는 루시퍼레이즈의 발현정도를 측정하기 위해서 효소 활성도를 측정하였다. 각각의 synthetic RNA로 형질전환된 세포 (3×10^5)를 생리식염수로 washing한 후, 직접 200 µl의 lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM EGTA, 1% [v/v]

Triton X-100)를 사용하여 lysis시켰다. 상온에서 20분 동안 배양한 다음, cell debris를 제거하기 위해서 cell lysate을 2분간 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 10~20 µl의 세포 추출액을 100 µl의 luciferase assay reagent [20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂ · 5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 µM coenzyme A (Sigma St. Louis, MO., USA), 470 µM luciferin (Promega, Madison, WI, USA), 530 µM ATP]와 섞어서 곧바로 루시퍼레이즈 활성도를 Luminometer로 사용하여 측정하였다.

결 과

1. PRRSV 게놈의 5'-말단 캡 구조의 필요성

PRRSV의 게놈 RNA는 세포의 mRNA와 마찬가지로 5'-말단에 캡 구조를 지니고 있다. 또한 PRRSV 뿐만 아니라, 이 바이러스를 포함하는 여러 종류의 많은 Arterivirus도 마찬가지이다 (24). 하지만 지금까지 캡 구조가 Arterivirus의 자가복제에 어떠한 기능을 하는지 연구된

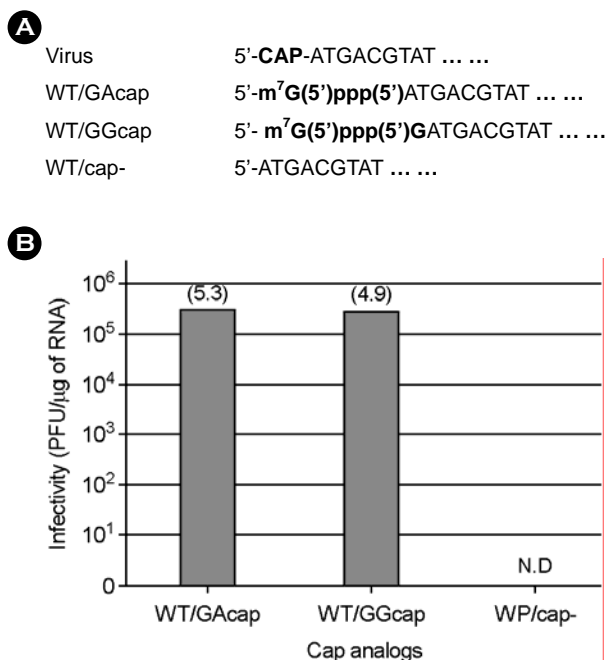


Figure 1. Requirement of the cap structure for PRRSV RNA replication. (A) Schematic presentation of the 5'-end region of three synthetic RNA transcripts derived from WT/GAcap, WT/GGcap, and WT/cap- cDNAs. (B) Determination of the specific infectivity of synthetic RNAs transcribed from the corresponding constructs. N.D., not detected.

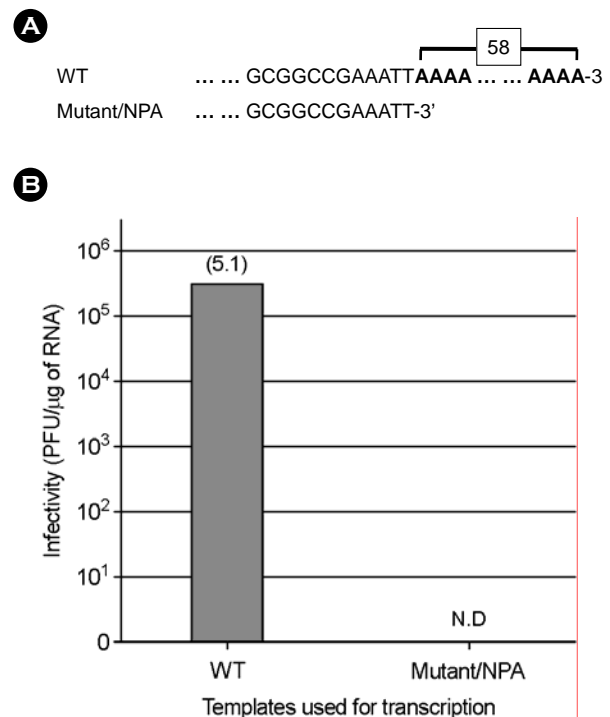


Figure 2. Requirement of the poly(A) tract for PRRSV RNA replication. (A) Schematic presentation of the 3'-end region of WT and Mutant/NPA that does not contain the poly(A) tail. (B) Determination of the specific infectivity of synthetic RNAs transcribed from WT and Mutant/NPA constructs. N.D., not detected.

바 없다. 따라서 본 연구에서는 PRRSV의 자가복제 시스템을 이용하여, 바이러스의 게놈 5'-말단에 존재하는 캡 구조의 기능을 알아보고자 하였다.

Fig. 1에 나타낸 것과 같이 PRRSV의 infectious cDNA를 주형으로 사용하여 시험관 내 전사반응을 통해서 synthetic genome-length RNA를 합성할 때, m⁷G(5')ppp(5')A 또는 m⁷G(5')ppp(5')G 캡 유사체를 반응액에 첨가하거나, 혹은 전혀 유사체를 첨가하지 않음으로써, WT/GAcap, WT/GGcap, 또는 WT/cap- 라고 명명된 RNA를 각각 합성하였다 (Fig. 1A). 합성된 RNA가 스스로 자가복제를 할 수 있는 지를 분석하기 위해서, BHK 세포에 형질전

환시킨 후, 이들의 특이적 감염도를 정량적으로 분석하였다. 실험결과, m⁷G(5')ppp(5')A를 첨가하여 합성된 WT/GAcap RNA는 5.3×10⁵ PFU/μg의 감염도를 나타냈으며 (Fig. 1B). 이 수치는 지난 논문에서 밝힌 바와 동일한 결과이다 (5). m⁷G(5')ppp(5')G를 첨가하여 합성된 WT/GGcap RNA의 경우, WT/GAcap와 유사하게 4.9×10⁵ PFU/μg의 감염도를 나타내었다 (Fig. 1B). m⁷G(5')ppp(5')G 캡 유사체를 첨가하여 RNA를 합성할 경우, 바이러스의 게놈 5'-말단에 바이러스의 염기 이외에 추가로 한 개의 G 염기를 삽입하게 된다 (Fig. 1A). 따라서 본 실험결과 우리는 PRRSV 5'-말단에 추가된 하나의 G 염기는 RNA의

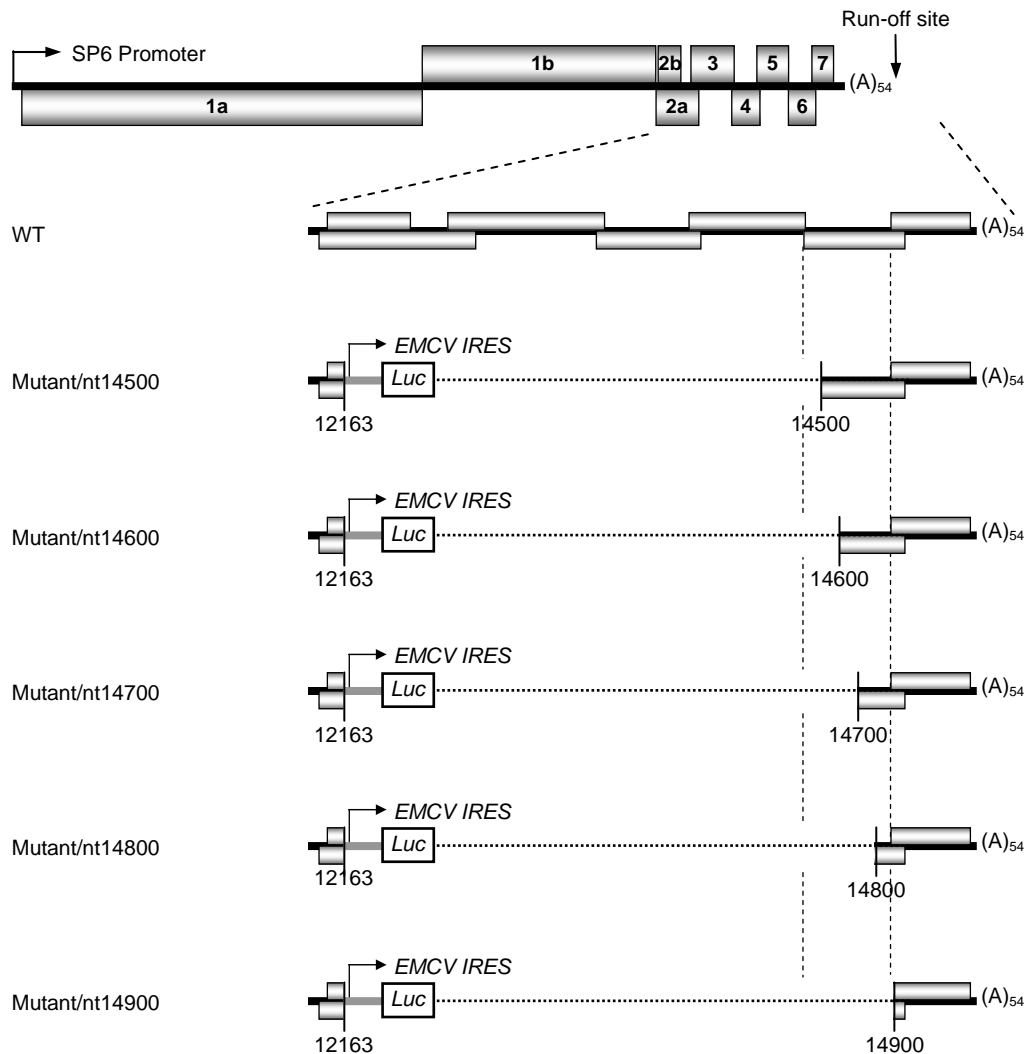


Figure 3. Schematic depiction of luciferase-expressing PRRSV viral replicons. The five viral replicons Mutant/nt14500, Mutant/nt14600, Mutant/nt14700, Mutant/nt14800, and Mutant/nt14900 have large internal deletions of nt 12163~14500, nt 12163~14600, nt 12163~14700, nt 12163~14800, and nt 12163~14900, respectively. An expression cassette consisting of the EMCV IRES-driven LUC gene was inserted at the deletion site to facilitate the monitoring of viral replication.

특이적 감염도에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 또한, 시험관 내 전사반응시 캡 유사체를 전혀 첨가하지 않았을 경우 합성되는 WT/cap-의 RNA 경우, 본 실험에서 감염성을 탐지할 수 없었다 (Fig. 1B). 이 실험 결과, PRRSV 계놈 RNA의 5'-말단에 존재하는 캡 구조는 바이러스의 RNA 자가복제에 필수적인 인자임을 알 수 있었다.

2. PRRSV 계놈의 3'-말단 poly(A) tail의 필요성

PRRSV의 RNA 자가복제시 바이러스 계놈의 3'-말단에 존재하는 poly(A) tail이 중요한 역할을 하는지를 알아보기 위해서, poly(A) tail을 완전히 제거한 synthetic RNA를 위에서 기술한 시험관 내 전사반응을 통해서 합성하고자 하였다. 이를 위해서 full-length infectious PRRSV cDNA (wild-type, WT)을 엔지니어링하여 바이러스 계놈 3'-말단에 존재하는 54개의 A 염기를 완전히 제거한 Mutant/NPA cDNA 플라스미드를 재료 및 방법에 기술한 것과 같이 제작하였다 (Fig. 2A). Mutant/NPA cDNA를 주형으로 사용하여 시험관 내 전사반응을 통해서 다량의 unpolysaccharidylated RNA를 합성하였다 (data not shown). 합성된 Mutant/NPA RNA를 BHK 세포에 형질전환시킨 후, 이것의 측정된 감염도를 WT와 비교하였다.

Fig. 2B에 나타난 것과 같이, WT RNA의 경우 예상한 것과 같이 5.1×10^5 PFU/ μ g의 감염도를 나타낸 반면, Mutant/NPA RNA의 경우 전혀 감염도가 탐지되지 않았다 (Fig. 2B). 본 실험을 통해서 우리는 PRRSV 계놈 RNA의 3'-말단에 존재하는 poly(A) tail이 바이러스의 RNA 자가복제에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

3. PRRSV 계놈의 3'-말단부위에 존재하는 100 뉴클레오타이드의 중요성

지난 연구결과를 토대로 우리는 PRRSV 계놈의 3'-말단으로부터 약 911 뉴클레오타이드는 바이러스의 자가복제에 필수적인 요소라는 것을 알 수 있었다 (5). 본 연구에서는 911 뉴클레오타이드 내에 존재하는 cis-acting element를 더욱 세부적으로 동정하고자 하였다. 본 연구를 위해서 자가복제가 가능한 Mutant/nt14500 cDNA 플라스미드로부터 추가로 4개의 PRRSV cDNA 플라스미드 (Mutant/nt14600, Mutant/nt14700, Mutant/nt14800, 그리고 Mutant/nt14900)를 제작하였다 (Fig. 3). 각각의 mutant 플라스미드는 PRRSV 계놈의 3'-말단쪽 방향으로 100 뉴클

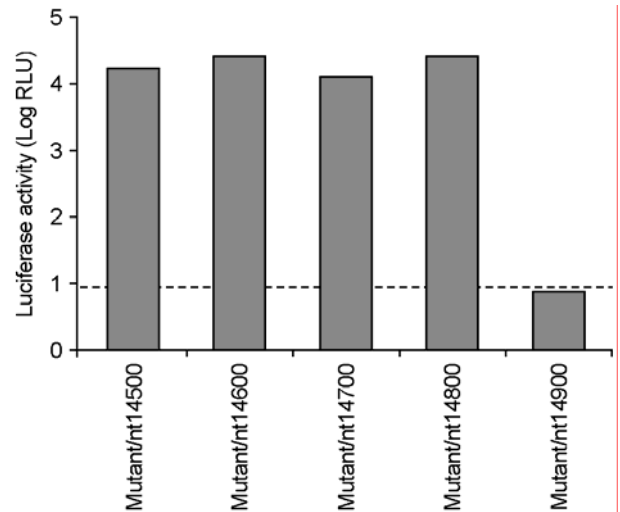


Figure 4. Expression of LUC gene. Naïve BHK-21 cells were transfected with the PRRSV RNAs transcribed from each cDNA template and seeded on 6-well plates at a density of 4×10^5 cells per well. After 36 hr incubation, cell lysates were prepared for LUC assays. The experiments were performed in duplicate; mean values are shown.

레오타이드의 추가 염기결절 (nucleotide deletion)을 가지고 있는 것이 특징이다. 또한, 이들 mutant cDNA들은 바이러스의 구조단백질에 염기결절을 가지고 있음으로, 감염성이 있는 바이러스는 생성되지 않는다. 따라서 각각의 mutant cDNA로부터 합성된 RNA의 자가복제 능력을 쉽게 분석하고자 EMCV IRES로부터 발현이 유도되는 루시페레이스 유전자 발현 카세트를 염기결절 부위에 삽입하였다. 이렇게 엔지니어링된 루시페레이스 유전자는 세포에 형질전환된 RNA의 자가복제에 의존적으로 발현된다.

이렇게 제작된 5개의 cDNA 플라스미드를 주형으로 사용하여 각각의 mutant RNA를 시험관 내 전사반응으로 합성하였다 (data not shown). 합성된 RNA를 BHK 세포에 형질전환시킨 후 36시간이 경과한 다음, 각각의 형질전환된 세포의 lysate에 포함된 루시페레이스의 활성도를 측정하였다. Fig. 4에 나타난 것과 같이 Mutant/nt14900을 제외한 나머지 4개의 mutant RNA로부터 $1.5 \sim 5 \times 10^4$ RLU의 루시페레이스의 활성을 관찰하였다. 그러나, Mutant/nt14900 RNA로부터 얻어진 루시페레이스의 활성도는 10 이하로 나타났으며, 이것은 형질전환되지 않은 BHK 세포로부터 얻어진 활성도와 유사하였다. 그러므로, 본 실험을 통해서 Mutant/nt14900 RNA는 RNA 자가복제를 하지 않는다는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 Mutant/

nt14800와 Mutant/nt14900 사이에 추가로 결절된 100개의 뉴클레오타이드가 바이러스의 RNA 자가복제에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

고 찰

본 연구에서는 PRRSV의 자가복제에 필수적인 cis-acting RNA elements를 동정하였다. PRRSV의 역전사유전자 시스템을 이용하여 바이러스의 게놈 RNA를 조작함으로써, 1) 게놈 5'-말단에 존재하는 캡 구조, 2) 게놈 3'-말단에 존재하는 poly(A) tail, 그리고 3) 게놈의 3'-말단부위인 N 유전자 바로 앞부위에 존재하는 약 100개의 염기가 바이러스의 RNA 게놈 자가복제에 절대적으로 필요하다라는 것을 알 수 있었다. PRRSV 이외에 다른 많은 RNA 바이러스의 게놈의 5'과 3' 말단에 각각 캡 구조와 poly(A) tail을 가지고 있으므로, 본 연구결과를 통해서 밝혀진 사실은 이들 바이러스의 자가복제를 이해하는데 많은 도움이 될 것으로 기대된다. 더 나아가 앞으로 이들 게놈의 구조 및 염기들이 바이러스의 자가복제에 어떻게 관여하는 지에 대한 분자생물학적 메커니즘에 관한 연구가 절실히 필요하다.

RNA의 5'-말단에 존재하는 캡 구조는 mRNA부터 단백질 발현에 중요한 역할을 한다 (6). 즉 이들은 cap-dependent translation에 관여함으로써, 효과적으로 ribosome을 mRNA의 5'-말단에 recruit하는데 도움을 준다. 이와 마찬가지로 PRRSV 게놈 5'-말단에 존재하는 캡 구조는 바이러스의 단백질을 발현하는데 결정적인 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있었다 (Yun SI and Lee YM, unpublished). 하지만 이러한 번역 (translation)과 관련된 5' 캡 기능만으로는 본 실험에서 관찰한 uncapped RNA의 감염도를 모두 설명할 수 없다. 그러므로, 바이러스 게놈의 5'-말단에 존재하는 캡 구조는 직접 또는 간접적으로 RNA의 합성에 관여할 것으로 생각된다. 앞으로 이것과 관련된 분자생물학적 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

Poly(A) tail의 존재는 피코나바이러스의 RNA 폴리머레이즈가 바이러스의 3'-말단에 결합하는데 필수적이며 (8), 코로나바이러스의 경우 음성-가닥의 RNA 합성에 중요한 역할을 한다 (15). 또한 poly(A) tail을 가지고 있는 많은 바이러스의 음성-가닥은 이들의 5'-말단에 poly(U) tail을 가지고 있으며 (9,11,28,31), poly(U) sequence는 시험관

내에서 피코나바이러스의 음성-가닥 RNA 합성에 관여한다 (1,27). 이러한 설명이 PRRSV에도 적용될지는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

Beet necrotic yellow vein virus RNA 3의 경우, poly(A) tract이 제거된 RNA 전사체에 poly(A) tract이 첨가되어진다고 보고된 바 있다 (12). 그러나, nonviral U-rich sequence가 바이러스의 3'-말단과 poly(A) tail 사이에 추가되어진다. 비록 poly(A) tail이 다시 획득되는 것은 바이러스의 폴리머레이즈 혹은 세포의 poly(A) polymerase에 의해서 이루어질 것으로 제안되었지만, 다른 메커니즘이 segmented genome을 가진 바이러스에서 제안되기도 하였다. Turnip crinkle virus sat-RNA의 경우, RNA 1 또는 2에 의해서 만들어진 poly(A)-RNA polymerase complex에 의해서 3'-말단이 수리될 수 있다는 가능성과 유사한 방법도 가능할 것으로 생각된다 (22).

마지막으로, PRRSV 게놈 RNA의 자가복제에는 바이러스의 게놈 내부에 존재하는 sequence가 절대적으로 필요하다라는 것을 알 수 있었다. 이 sequence는 바이러스의 N 유전자의 바로 앞부위에 위치하며, 컴퓨터 RNA 이차구조 예상 프로그램을 적용한 결과, 여러 개의 stem-loop 구조를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다 (24). 이러한 stem-loop 구조가 PRRSV의 RNA replication 뿐 만 아니라, RNA transcription 및 subgenomic RNA의 합성에 어떠한 역할을 하는지 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이러한 염기서열 특이적인 구조는 앞으로 항바이러스 제제의 개발에 매우 중요한 기초자료를 제공하리라 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Andrews NC, Baltimore D: Purification of a terminal uridylyltransferase that acts as host factor in the in vitro poliovirus replicase reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 221-225, 1986.
- 2) Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorceyca D, Chladek D: Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* **4**: 127-133, 1992.
- 3) Brierley I, Digard P, Inglis SC: Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**: 537-547, 1989.
- 4) Cavanagh D: Nidovirales: a new order comprising Corona-

- viridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**: 629-633, 1997.
- 5) **Choi YJ, Yun SI, Kang SY, Lee YM**: Identification of 5' and 3' cis-acting elements of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus: acquisition of novel 5' AU-rich sequences restored replication of a 5'-proximal 7-nucleotide deletion mutant. *J Virol* **80**: 723-736, 2006.
 - 7) **Clyde K, Harris E**: RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol* **80**: 2170-2182, 2006.
 - 7) **Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca DE, Chladek DW**: Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* **4**: 117-126, 1992.
 - 8) **Cui T, Sankar S, Portar AG**: Binding of encephalomyocarditis virus RNA polymerase to the 3'-noncoding region of the viral RNA is specific and requires the 3'-poly(A) tail. *J Biol Chem* **266**: 26093-26098, 1993.
 - 9) **Dolja VV, Grama DP, Morozov SY, Atabekov JG**: Potato virus X-related single- and double-stranded RNAs: characterization and identification of terminal structures. *FEBS Lett* **214**: 308-312, 1987.
 - 10) **Gagnon CA, Dea S**: Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can J Vet Res* **62**: 110-116, 1998.
 - 11) **Hofmann MA, Brian DA**: The 5' end of coronavirus minus-strand RNAs contains a short poly(U) tract. *J Virol* **65**: 6331-6333, 1991.
 - 12) **Jupin I, Bouzoubaa S, Richards K, Jonard G, Guiley H**: Multiplication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 lacking a 3' poly(A) tail is accompanied by reappearance of the poly(A) tail and novel short U-rich tract preceding it. *Virology* **178**: 281-284, 1990.
 - 13) **Kang SY, Yun SI, Park HS, Park CK, Choi HS, Lee YM**: Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* **104**: 165-179, 2004.
 - 14) **Kwang J, Kim HS, Joo HS**: Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *J Vet Diagn Invest* **6**: 293-296, 1994.
 - 15) **Lin YJ, Liao CL, Lai MMC**: Identification of the cis-acting signal for minus-strand RNA synthesis of a murine coronavirus: Implications for the role of minus-strand RNA in RNA replication and transcription. *J Virol* **68**: 8131-8140, 1994.
 - 16) **Mardassi H, Mounir S, Dea S**: Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **75**: 681-685, 1994.
 - 17) **Meng XJ, Paul PS, Halbur PG**: Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **75**: 1795-1801, 1994.
 - 18) **Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Lum MA**: Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch Virol* **140**: 745-755, 1995.
 - 19) **Meulenbergh JJM, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PLJM, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJM**: Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* **192**: 62-72, 1993.
 - 20) **Morozov I, Meng XJ, Paul PS**: Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2-4 of a US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* **140**: 1313-1319, 1995.
 - 21) **Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT**: Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* **140**: 1451-1460, 1995.
 - 22) **Nagy PD, Carpenter CD, Simon AE**: A novel 3'-end repair mechanism in an RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1113-1118, 1997.
 - 23) **Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS**: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* **73**: 270-280, 1999.
 - 24) **Pasternak AO, Spaan WJM, Snijder EJ**: Nidovirus transcription: how to make sense...?. *J Gen Virol* **87**: 1403-1421.
 - 25) **Sagripanti JL, Zandomeni RO, Weinmann R**: The cap structure of simian hemorrhagic fever virion RNA. *Virology* **151**: 146-150, 1986.
 - 26) **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory,

- Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 27) **Sangker S, Proter AG:** Expression, purification, and properties of recombinant encephalomyocarditis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **65**: 2993-3000, 1991.
 - 28) **Sawicki DL, Gomatos PJ:** Replication of semliki forest virus: Polyadenylate in plus-strand RNA and polyuridylylate in minus-strand RNA. *J Virol* **20**: 446-464, 1976.
 - 29) **Snijder EJ, Meulenberg JJM:** The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* **79**: 961-979, 1998.
 - 30) **Snijder EJ, van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJ, de Vries AA:** Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* **73**: 6335-6345, 1999.
 - 31) **Spector DH, Baltimore D:** Polyadenylic acid on poliovirus RNA. IV. Poly(U) in replicative intermediate and double-stranded RNA. *Virology* **67**: 498-505, 1975.
 - 32) **Wensvoort G:** Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res* **24**: 117-124, 1993.
 - 33) **Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, vant Veld P, Groenland GJR, van Gennep JA, Voets MT, Verheijden JHM, Braamskamp J:** Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* **13**: 121-130, 1991.
-