

## 돼지생식기호흡기증후군 바이러스의 Nucleocapsid 단백질의 세포 내 분포

충북대학교 의과대학 미생물학교실, 의학연구소<sup>1</sup>, 충북대학교 수의과대학 동물의학연구소<sup>2</sup>

윤상임<sup>1</sup> · 최유정<sup>1</sup> · 송병학<sup>1</sup> · 강신영<sup>2</sup> · 이영민<sup>1\*</sup>

### Intracellular Localization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein

Sang-Im Yun<sup>1</sup>, Yu-Jeong Choi<sup>1</sup>, Byung-Hak Song<sup>1</sup>, Shien-Young Kang<sup>2</sup> and Young-Min Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Medicine and Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea

Received : February 28, 2008

Accepted : March 14, 2008

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a small enveloped, positive-stranded RNA virus belonging to the family *Arteriviridae*. It causes the porcine reproductive and respiratory syndrome in swine. The virus has 7 structural proteins. Of the seven, the N protein is the nucleocapsid that comprises a core of the virus particle. We have expressed the N protein of PRRSV PL97-1/LP1 strain using a heterologous gene expression vector derived from Sindbis virus, called pSinrep5. Immunofluorescence analysis showed that the N proteins were mainly found in the cytoplasm as well as in the nucleus of BHK-21 cells transfected with pSinrep5-N-derived RNA. Moreover, expression of the N protein did not change the incompetence of RNA replication of Mutant/nt14900 that lacks a 3' *cis*-acting replication element and the efficiency of RNA replication of Mutant/nt14800 that has a low level of RNA replication. Overall, our findings are consistent with previous results and help to understand a role of the N protein in PRRSV biology.

**Key Words:** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; RNA virus; Nucleocapsid; Immunofluorescence

## 서 론

돼지생식기호흡기증후군 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)는 전 세계적으로 돼지 축산업에서 경제적으로 가장 중요한 질병중의 하나이다 (23). 이 질병은 암태지에서 유산 또는 사산을 일으키며, 새끼

돼지에서는 심각한 호흡기 질환을 일으키는 특징을 가지고 있다 (10,17). 이 질병은 1987년 북미에서 처음 발견되었으며 (15), 이어 1990년 유럽에서도 발견되었다. 그 이후 미국과 네덜란드에서 이 질병의 원인체로 PRRS 바이러스 (PRRSV)를 각각 독립적으로 분리하였다 (6,33). PRRSV의 북미분리주 (VR-2332)와 유럽분리주 (Lelystad)는 형태학적으로나 계통의 구조적인 측면에서 유사하나, 유전학적으로나 항원적인 측면에서는 단지 약 60~70%의 염기상동성 (sequence homology)를 가지고 있다 (18,22, 35). 따라서, VR-2332와 Lelystad 분리주들을 각각 PRRSV의 북미주 (North American strain)과 유럽주 (European strain)의 prototype으로 명명하였다.

\*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

\*\*이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

바이러스학적인 측면에서 PRRSV는 외피 (envelope)를 가진 작은 바이러스이며, 약 15 kb 크기의 단일가닥의 양성-극성 RNA를 게놈으로 가지고 있다 (19,30). 분류학적인 측면에서 PRRSV는 아테리비리데 과 (*Arteriviridae* family)의 아테리바이러스 속 (*Arterivirus* genus)에 속하며, 이 속에는 PRRSV외에도 말에 감염되는 equine arteritis virus (EAV), 마우스에 감염되는 lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) 및 원숭이에 감염되는 simian hemorrhagic fever virus (SHFV)가 있다 (7). PRRSV의 게놈구조를 보면, 5'-말단에서부터 5' 비번역부위 (nontranslated region, NTR), 9개의 open reading frame, 3' 비번역부위, 그리고 3'-말단에 poly(A)가 존재한다 (30). 9개의 open reading frame 중에서 ORF1a와 ORF1b는 각각 1a와 1b로 명명된 다단백질 (polyprotein)로 발현되며, 이것들은 모두 RNA 복제와 전사에 관여하는 것으로 여겨지는 13개의 단백질로 가수분해되는 것으로 생각된다 (5,32,35). 그리고 ORF2a, 2b, 3, 4, 5, 6 및 7은 GP2a, 2b, GP3, GP4, GP5, M 및 N으로 명명된 단백질로 발현되며, 이들은 모두 바이러스의 구조단백질이다 (20,30,38).

N (nucleocapsid의 약칭) 단백질은 약 120개 정도의 아미노산으로 구성되어 있으며, 염기성을 띤다. 이 단백질은 매우 면역성이 높으며, 감염된 세포 내에서 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 추측된다 (24,36). 바이러스 구조단백질의 하나인 N 단백질은 serine phosphoprotein임이 밝혀졌지만, 아직 그 기능은 알려지지 않고 있다 (37). N 단백질이 바이러스의 코어 (core) 구조를 형성하기 위해서는 N-N dimerization이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (16). PRRSV는 세포에 감염된 후, 다른 RNA 바이러스와 같이 PRRSV 바이러스 복제가 세포질에서 이루어진다. 이 과정에서 N 단백질은 주로 세포질과 핵 주변에 존재하는 것으로 알려져 있다. 하지만 최근의 연구에서 PRRSV의 N 단백질이 핵 내에도 존재한다는 것이 새롭게 알려졌으나, 기능적인 측면에서 이점의 중요성은 아직 밝혀지지 않았다 (25). 또한 EAV와 avian infectious bronchitis virus를 포함한 다른 코로나바이러스들에서도 N 단백질이 세포질 뿐만 아니라 핵에서도 존재한다 (12,39).

본 연구에서는 이형유전자 발현벡터인 pSinrep5 시스템을 사용하여 PRRSV의 N 단백질을 BHK-21 세포에서 발현하고, 이들이 세포의 어디에 존재하는지 조사하였다. 또한 이 발현시스템을 이용하여 PRRSV N 단백질이 바이러스의 RNA 자가복제에 어떠한 영향을 미치는

지를 정량적으로 분석하고자 하였다. 본 연구를 통해서 PRRSV N 단백질은 단기적으로 뿐만 아니라, 장기적으로 BHK-21 세포에서 발현시킬 수 있으며, 발현된 N 단백질은 세포질 뿐만 아니라 핵 내에도 존재한다는 것을 관찰하였다. 또한, PRRSV의 감염없이 독립적으로 발현된 N 단백질은 PRRSV의 RNA 자가복제에 영향을 거의 끼치지 않았다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

BHK-21 세포는 alpha minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) 배지에 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum), 2 mM L-글루타민, 비타민, 및 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3~4일마다 1:4 또는 1:5로 계대배양하였다. 세포배양에 필요한 모든 시약 및 재료는 Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 면역형광검사에 사용된 PRRSV N 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체는 PRRSV 바이러스 입자를 항원으로 사용하여 제작된 단클론항체이며, PRRSV에 감염된 세포를 이용하여 면역형광법으로 스크리닝하였다.

### 2. 플라스미드 합성

본 연구에 사용된 플라스미드는 일반적인 DNA 재조합 기법을 사용하여 제작, 분리, 및 정제하였다 (28). PRRSV의 N 유전자를 발현하기 위해서 Sindbis virus로부터 유래한 pSinrep5 (1) 이형유전자 발현벡터를 사용하였다. 먼저 PRRSV의 국내분리주인 PL97-1/LP1 (GenBank accession no. AY612613)의 게놈 RNA를 주형으로 사용하여 RT-PCR을 수행함으로써 전체 N 유전자 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성에 사용된 프라이머는 다음과 같다: Forward, 5'-GATTCTAGAAATGCCAAATAACAAC; Reverse, 5'-ATCGTTTAAACTTATCATGCTGAGGGTGA. 이렇게 합성된 cDNA 단편을 pSinrep5 벡터에 Xho I (forward 프라이머의 밀줄친 부분)과 Pme I (reverse 프라이머의 밀줄친 부분)의 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 삽입된 PRRSV의 N 유전자는 pSinrep5 벡터에 존재하는 sub-genomic promoter에 의해서 발현되도록 디자인되었다.

### 3. PCR 반응

PCR 반응은 2.5 U의 Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 100  $\mu$ l 반응액에서 이루어졌다. 일반적인 반응액의 조성은 Pyrobest DNA polymerase와 함께 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200  $\mu$ M dNTPs, 0.4  $\mu$ M 프라이머를 포함시켰다. 일반적인 PCR 증폭은 한 사이클을 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), 및 extension (72°C, 1분)으로 구성하여 총 30 사이클을 실행하였으며, 마지막 단계에서 72°C에서 10분 동안 유지하였다.

### 4. RNA 합성

RNA 전사체는 시험관 내 전사반응 (in vitro transcription reaction)에 의해서 합성되었다. 전사반응은 다음과 같이 수행되었다. Xho I으로 절단된 약 100~200 ng의 cDNA 플라스미드 주형을 25  $\mu$ l 반응액에 첨가하였다. 반응액의 조성은 cDNA 플라스미드 주형이외에 0.6 mM 캡 유사체 (cap analog, m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), 10 mM DTT, 1 mM UTP, GTP, CTP, 및 ATP, 40 U RNaseOUT, 15 U SP6 RNA polymerase (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA), 그리고 버퍼를 포함하였다. 반응은 37°C에서 1시간 동안 지속되었

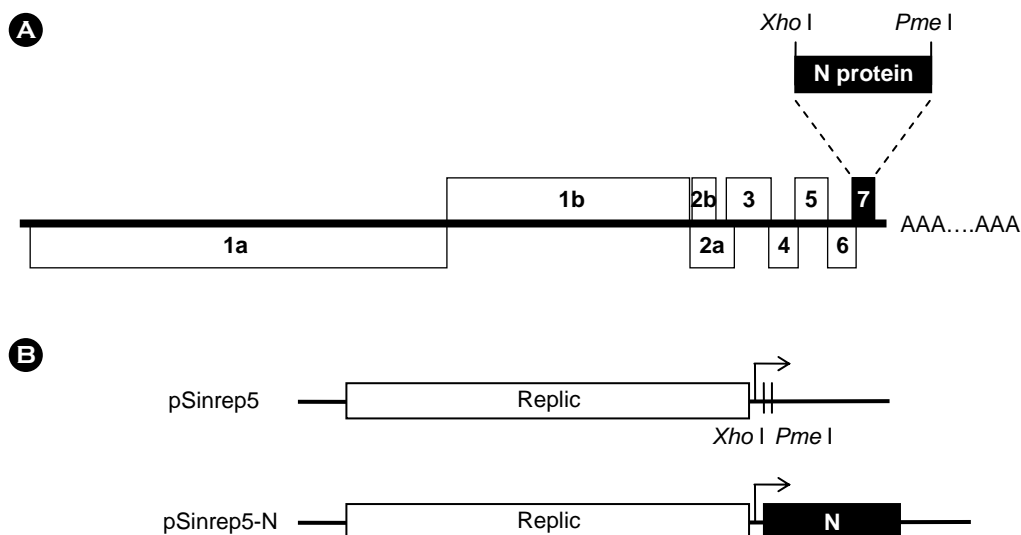
다. 반응이 종결된 후, 반응액의 1~1.5  $\mu$ l를 사용하여 아가로스젤 전기영동을 실시하여 합성된 RNA 전사체의 완전한 상태를 확인하였으며, 나머지 반응액에 포함된 RNA 전사체는 2.5 M LiCl를 사용하여 -20°C에서 1시간 동안 침전시키고, 14,000rpm 에서 10분 동안 원심분리하였다. 분리된 RNA 전사체는 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O에 녹인 후 필요할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

### 5. RNA 이입 (RNA transfection)

Electroporation에 의해서 RNA 전사체가 BHK-21 세포에 전달되었다 (41). 간단히 설명하면 다음과 같다. 아포화 상태의 세포를 트립신을 사용하여 배양접시로부터 분리한 후, 차가운 생리식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)로 3차례 세척하였다. 이렇게 세척된 세포는 1 ml당  $2 \times 10^7$  세포의 농도로 재부양시켰다. 준비된 2  $\mu$ g의 RNA 전사체와 400  $\mu$ l의 세포를 섞은 후, electroporation을 실시하였다. Electroporation는 980 V를 사용하여 99  $\mu$ s pulse length에서 5번 실시하였다. 이렇게 RNA를 이입한 세포를 10분 동안 방치한 다음, 10 ml의 배양액과 함께 배양 접시로 옮겼다.

### 6. 면역형광검사

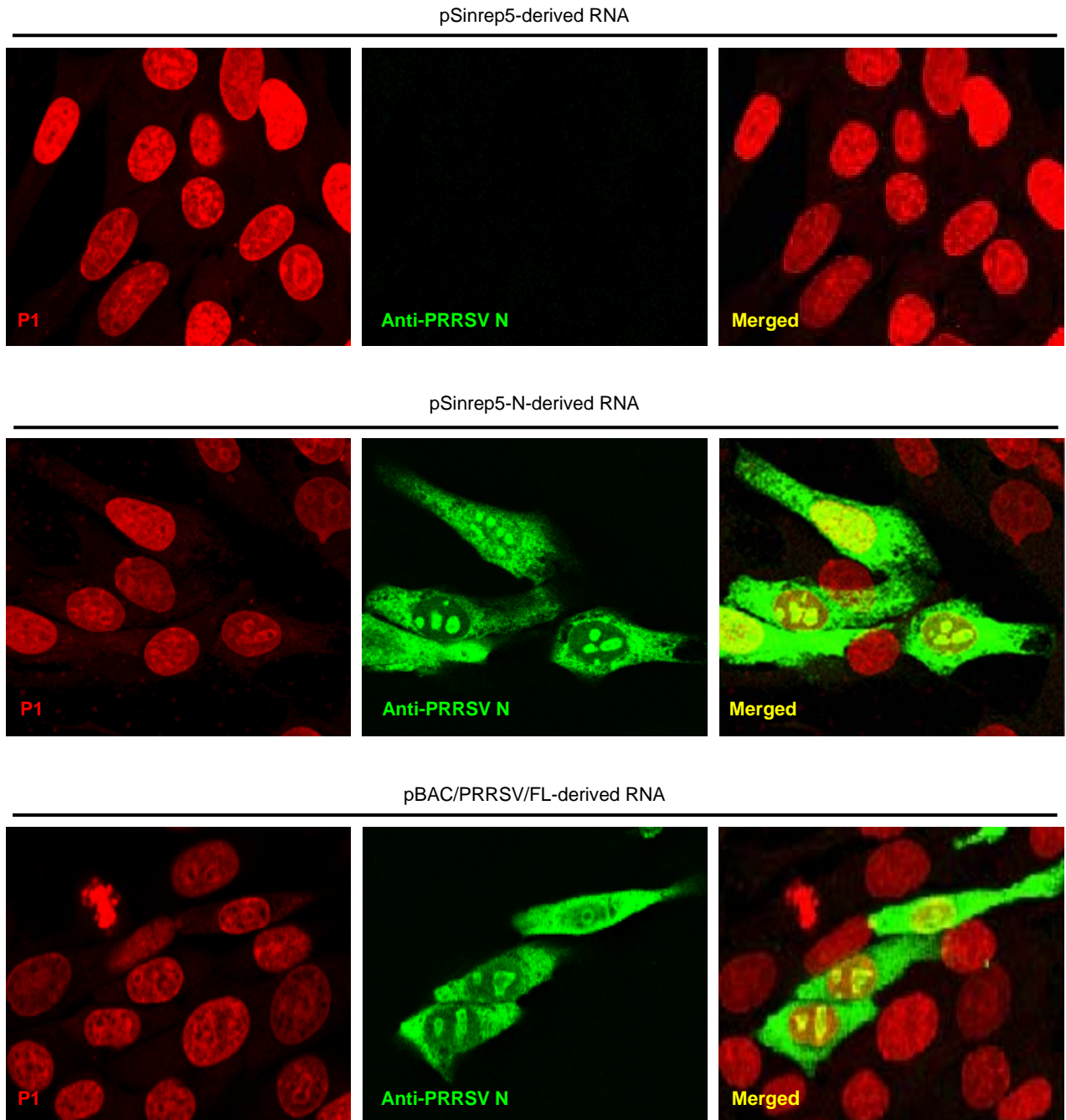
PRRSV N 유전자를 발현하는 벡터로 RNA를 이입한



**Figure 1.** Schematic view of the PRRSV N protein expression vector. (A) Organization of PRRSV genomic RNA. The full-length PRRSV ORF7 was amplified from the genome of PL97-1/LP1 strain, as described in Materials and Methods. (B) Schematic presentation of the PRRSV N protein expression vector. The Sinrep5, derived from Sindbis virus, was used for the expression of the PRRSV N protein. The full-length PRRSV ORF7 (N protein) was inserted immediately downstream of the subgenomic promoter (arrows) of Sindbis virus, generating pSinrep5-N.

BHK-21 세포로부터 단백질의 발현여부를 분석하기 위해 서 면역형광검사법을 실시하였다. 기술된 벡터로 RNA를 이입한 BHK-21 세포를 4-well chamber slide에  $2 \times 10^5$ 의 농도로 접종하였다. 24시간 배양 후, 세포는 PRRSV N

단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 사용하여 면역염색 (immunostaining)을 하기 위해서 0.37% (vol/vol)로 희석된 포르말데하이드/PBS 용액으로 25℃에서 30분 동안 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS를 사용하여 3차례



**Figure 2.** Intracellular localization of the PRRSV N protein. BHK-21 cells were transfected with the RNA transcripts derived from one of either pSinrep5, pSinrep5-N, or pBAC/PRRSV/FL (9) that is a full-length infectious PRRSV cDNA. After incubation for 20 h, cells were fixed and staining with a PRRSV N-specific monoclonal antibody and a FITC-conjugated anti-mouse IgG (green). At the end of immunostaining, the cells were stained with PI (red) for the nucleus. Also shown are merged images (yellow).

세척한 후, 0.2% (vol/vol)로 희석된 Triton X-100/PBS 용액으로 투과 (permeabilization)시켰다. 그 이후 세포는 4차례 PBS 세척과 15분 동안의 PBS 재수화 (rehydration) 단계를 거친 다음, 1시간 동안 5% 우혈청알부민 (bovine serum albumin)으로 blocking을 실시하였다. 면역염색을 위해서 세포는 PRRSV N 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체 (1:1000)와 함께 25°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포는 3차례 PBS 세척을 거친 후 다시 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 염소 항-마우스 면역글로불린 G (Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA, USA; 1:1000)와 함께 25°C에서 2시간 동안 배양하였다. 이렇게 염색된 세포는 마지막으로 3차례의 PBS 세척 단계를 마친 후, 5 µg/ml propidium iodide (PI)와 5 µg/ml RNase A가 첨가된 PBS로 30분 동안 배양하였다. 이렇게 염색된 세포를 80% 글리세롤을 사용하여 mounting하였다.

#### 7. 루시퍼레이즈 에세이

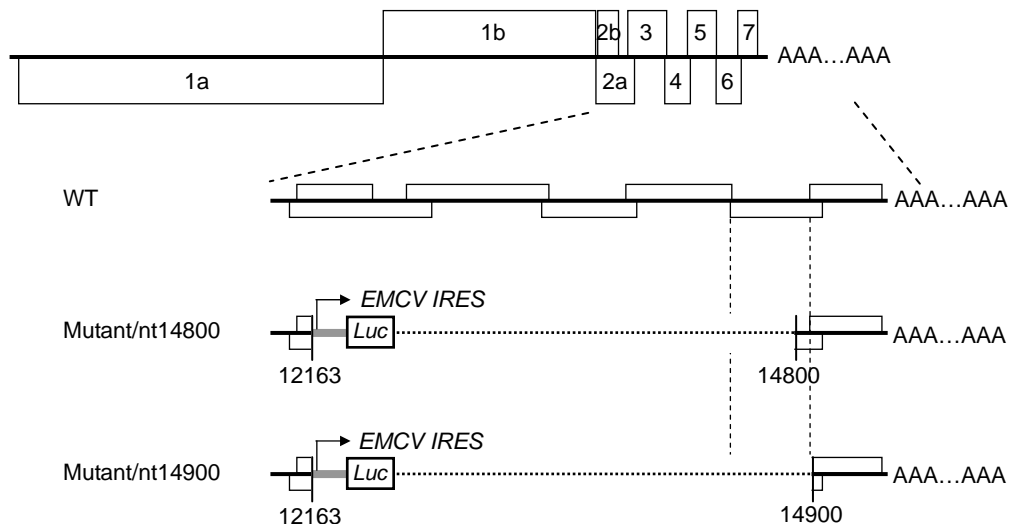
RNA를 이입한 BHK-21 세포를 6-well plate에 하나의 well에  $3 \times 10^5$  세포를 접종하였다. 정해진 시간에 세포는  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{Mg}^{2+}$ 가 첨가되지 않은 PBS로 1차례 세척한 다음, 0.2 ml의 lysis buffer [25 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane- $\text{N,N,N',N'}$ -tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100 (vol/vol)]를 사용하여 용해

시켰다. 용해된 cell lysate을 10분 동안 상온에서 둔 후, cell debris를 원심분리로 제거하였다. 분리된 상층액은 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다. 이입된 벡터로부터 발현된 루시퍼레이즈의 활성도를 측정하기 위해서 루시퍼레이즈 에세이를 수행하였다. 간단히 요약하면, 20 µl의 cell lysate을 100 µl의 luciferase assay reagent [20 mM Tricine, 1.07 mM ( $\text{MgCO}_3$ ) $_4\text{Mg(OH)}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2.67 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 µM coenzyme A, 470 µM luciferin (Promega, Madison, WI, USA), 530 µM ATP]를 기질 (substrate)로 사용하여 luminometer로 측정하였다. 평균 활성도는 2번의 실험결과로부터 얻었다.

## 결 과

### 1. PRRSV의 N 단백질을 발현하는 이형유전자 발현벡터 제작

본 연구에서는 PRRSV의 바이러스 코어를 형성하는데 주요 구성성분인 N 단백질을 바이러스의 감염과 독립적으로 이형유전자 발현시스템을 이용하여 발현하고자 하였다. 이를 위해서 PRRSV의 국내분리주 PL97-1/LP1 (9)의 게놈 RNA를 주형으로 사용하여, 게놈의 3'-말단에 위치한 ORF7 전체를 증폭하여 Xho I과 Pme I 제한효소가 양쪽 말단에 첨가된 cDNA를 합성하였다 (Fig. 1A). 합성된 cDNA를 Sindbis virus에서 유래한 pSinrep5 이형유전자



**Figure 3.** Schematic view of two PRRSV replicons, Mutant/nt14800 and Mutant/nt14900. While the Mutant/nt14800 replicon is competent for replication, with a low level of RNA replication being produced, the Mutant/nt14900 is replication-incompetent due to a lack of 3' cis-acting replication element (14). Dashed lines indicate a deleted region within the genome. Luc, luciferase gene. EMCV IRES, internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus.

발현백터에 삽입함으로써, PRRSV N 단백질 (ORF7 유전자)을 발현할 수 있는 pSinrep5-N 플라스미드를 합성하였다 (Fig. 1B). 본 실험에서 사용된 pSinrep5 백터는 모체인 Sindbis virus의 자가복제에 필요한 모든 효소를 발현하나, Sindbis virus의 구조단백질을 인코딩하는 부위를 결절 (deletion)시킨 벡터임으로, 감염성이 있는 바이러스 입자는 생성하지 못하는 특성을 가지고 있다. 또한, 삽입된 PRRSV N 단백질을 인코딩하는 ORF7 유전자는 Sindbis virus의 subgenomic promoter에 의해서 발현됨으로써, 세포 내에 전달되었을 때 Sindbis virus의 높은 자가복제율에 의해서 매우 효율적으로 발현되는 특성을 가지고 있다.

## 2. PRRSV의 N 단백질의 세포 내 위치

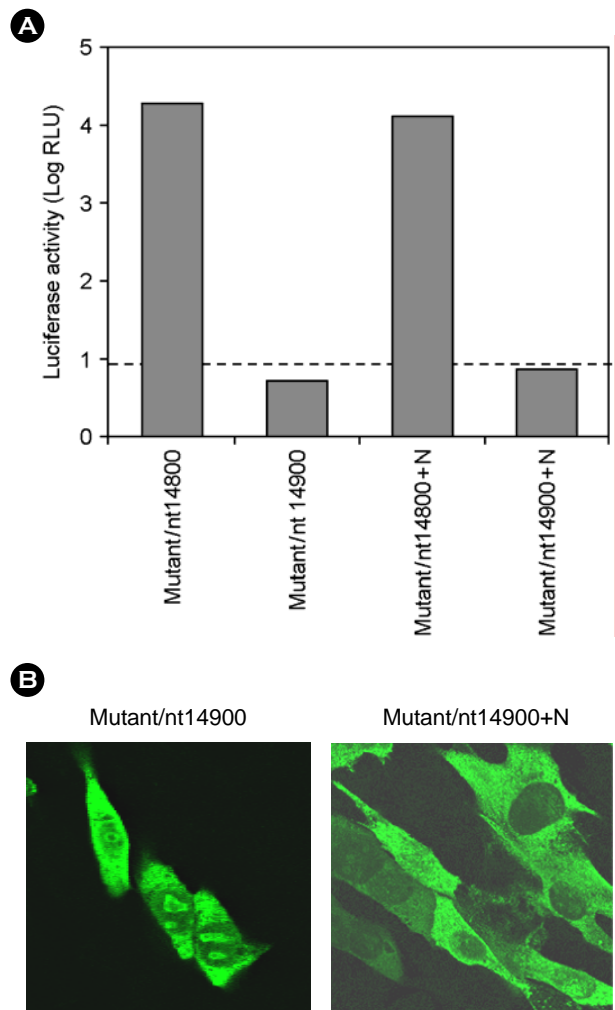
합성된 pSinrep5-N 백터를 사용하여 PRRSV의 N 단백질을 발현시키기 위해서, 먼저 합성된 백터로부터 SP6 RNA polymerase을 이용한 시험관 내 전사반응을 수행하였다. 이로부터 합성된 RNA 전사체를 BHK-21 세포에 electroporation 기법을 이용하여 이입시켰다. 본 실험의 음성대조군으로써 PRRSV의 ORF7 유전자를 가지고 있지 않은 pSinrep5 백터로부터 합성된 RNA 전사체를 이입시켰다. 또한 양성대조군으로 사용하기 위해서 full-length infectious PRRSV cDNA인 pBAC/PRRSV/FL (9)로부터 합성된 RNA 전사체를 이입시켰다. 각각의 RNA 전사체를 이입시킨 후 약 20시간이 경과한 다음, 각각의 세포들을 PRRSV N 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 사용하여 단백질의 발현여부와 발현된 단백질이 세포 내에서 어디에 존재하는지를 면역형광염색기법을 이용하여 관찰하였다. 본 실험에서는 세포 핵의 위치를 표시하기 위해서, 면역형광염색 마지막 단계에서 세포를 RNase A와 함께 PI로 염색하였다.

pSinrep5 백터로부터 합성된 RNA를 이입시킨 BHK-21 세포에서는 PRRSV N 단백질의 발현을 관찰할 수 없었다 (Fig. 2, pSinrep5-derived RNA). 이와는 대조적으로, pSinrep5-N 백터로부터 합성된 RNA를 이입시킨 BHK-21 세포에서는 PRRSV의 N 단백질에 특이적으로 반응하는 항체로 염색된 형광을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2, pSinrep5-N-derived RNA). 이러한 형광은 주로 핵 주위의 세포질 부위에서 강하게 나타났으며, 동시에 핵 내에서도 speckle 형태의 특이적인 패턴을 보였다. 또한, pSinrep5 백터로부터 발현된 PRRSV N 단백질의 세포 내 위치는 PRRSV의 full-length genomic RNA로부터 발현된 N 단백질의 분포와

유사하였다 (Fig. 2, pBAC/PRRSV/FL-derived RNA).

## 3. PRRSV RNA 자가복제에 N 단백질의 영향

PRRSV와 함께 아테리바이러스에 속해 있는 EAV의 경우 N 단백질을 포함한 모든 구조단백질은 genomic RNA 자가복제와 subgenomic RNA 전사에 필요하지 않고 보고된 바 있으나 (21,34,42), PRRSV와 유사한 코로나 바이러스의 경우 N 단백질이 효율적인 genomic RNA 자



**Figure 4.** Replicability of two PRRSV replicons in the presence or absence of PRRSV N protein. BHK-21 cells were transfected with the RNA transcripts derived from either of Mutant/nt14800 or Mutant/nt14900 alone or co-transfected together with the RNA transcripts derived from pSinrep5-N (+N). **(A)** After incubation for 20 h, cells were directly lysed with lysis buffer for luciferase assay, as described in Materials and Methods. Luciferase activities were measured twice and the mean values were presented. RLU, relative light units. **(B)** After incubation for 20 h, cells were fixed and staining with a PRRSV N-specific monoclonal antibody and a FITC-conjugated anti-mouse IgG.

가복제에 필수적인 것으로 보고된 바 있다 (2,29,31). 따라서 위에서 합성된 PRRSV N 단백질을 발현하는 벡터를 사용하여, PRRSV의 N 단백질이 PRRSV RNA 자가복제에 어떠한 영향을 미치는지를 분석하고자 하였다. 이를 위해서 지난 번의 연구결과 (9) 밝혀진 2개의 PRRSV replicon을 본 실험에 이용하고자 하였다 (14) (Fig. 3). 두 개 중 하나는 Mutant/nt14800이라고 명명되었으며, 이것은 PRRSV의 구조단백질 중에서 N 단백질을 발현하는 자가복제가 가능한 replicon이다. 나머지 하나는 Mutant/nt14900이라고 명명되었으며, 이것은 N 단백질을 포함한 모든 구조단백질을 인코딩하는 부위를 결절시킴으로써, 스스로 자가복제를 하지 못하는 replicon이다. 이 두 개의 PRRSV replicon이 N 단백질의 발현여부에 따라서 자가복제가 변하는 지를 분석하고자 하였다.

Mutant/nt14800과 Mutant/nt14900은 모두 reporter gene으로 루시퍼레이즈 유전자를 바이러스의 구조단백질을 인코딩하는 부위에 가지고 있음으로, 이들 각각의 자가복제를 루시퍼레이즈 에세이에 의해서 정량적으로 분석할 수 있다. 본 실험은 이들 2개의 replicon을 각각 BHK-21 세포에 이입시켰을 경우와 이들 2개의 replicon을 PRRSV N 단백질을 발현하는 pSinrep5-N벡터와 함께 이입시켰을 경우를 비교하였다. BHK-21 세포에 이입시킨 후 20시간이 경과한 다음, PRRSV replicon으로부터 발현되는 루시퍼레이즈의 활성도를 측정한 결과 PRRSV N 단백질이 존재하더라도 Mutant/nt14900의 자가복제는 일어나지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이것은 PRRSV N 단백질이 genome RNA 자가복제에 중요한 역할을 하지 않는다는 것을 의미한다.

## 고 찰

본 연구에서는 PRRSV 구조단백질 중의 하나인 N 단백질을 이형유전자 발현시스템을 이용하여 PRRSV의 감염없이 독립적으로 세포 내에서 단백질을 발현하였으며, 발현된 N 단백질이 세포질 뿐만 아니라 핵 내에도 존재한다는 것을 밝혔다. 또한 이러한 ectopic expression system을 사용하여, PRRSV의 N 단백질을 발현하였을 때 PRRSV의 genome RNA 자가복제에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

대부분의 RNA 바이러스의 경우, RNA 자가복제가 이루어지는 장소는 감염된 세포의 세포질이다. 그러나 최근

몇몇 RNA 바이러스의 경우 바이러스 단백질 중에서 몇 개는 핵이나 인 (nucleolus)에 위치한다고 보고된 바 있다 (11). 이것은 핵 또는 인에 위치한 바이러스 단백질이 바이러스의 자가복제에 도움이 되는 일련의 과정을 수행한다고 생각된다. 예를 들면, 세포의 전사를 억제하거나, 세포의 항바이러스 반응을 억제함으로써 바이러스의 세포 내 증식을 도모하고자 할 수 있다 (3,4,8,13). 하지만 PRRSV의 경우, 이와 관련된 연구결과는 미비한 상태이다.

다른 RNA 바이러스와 마찬가지로 PRRSV도 감염된 세포의 세포질에서 자가증식이 이루어진다. 그러나 PRRSV의 N 단백질은 감염된 돼지의 alveolar macrophage와 MARC-145 세포의 세포질 뿐만 아니라 핵 내에도 존재한다 (26,40). 최근 연구결과에 의하면, PRRSV N 단백질의 핵 내에 존재하는 것과 바이러스의 세포에 대한 독성 효과와는 상관관계가 없는 것으로 보고되었으며, 또한 감염성이 있는 바이러스를 생성하는 데에도 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다 (27). 하지만 동물실험의 결과 아직 정확한 작용기작은 알 수 없으나, N 단백질이 핵 내에 위치함으로써 host immune response를 조절할 수 있다고 보고된 바 있다 (16). 이러한 측면에서 본 연구에서 생성된 PRRSV N 단백질 발현벡터와 자가복제가 가능한 replicon을 이용하여 N 단백질과 세포 혹은 감염동물에서의 host response에 대한 연구가 가능할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Agapov EV, Frolov I, Lindenbach BD, Pragai BM, Schlesinger S, Rice CM: Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12989-12994, 1998.
- 2) Almazan F, Galan C, Enjuanes L: The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**: 12683-12688, 2004.
- 3) Aminev AG, Amineva SP, Palmenberg AC: Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res* **95**: 59-73, 2003.
- 4) Amineva SP, Aminev AG, Palmenberg AC, Gern JE: Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* **85**: 2969-2979, 2004.



- 5) **Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D, McGruder ED:** Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **298**: 258-270, 2002.
- 6) **Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorecya D, Chladek D:** Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* **4**: 127-133, 1992.
- 7) **Cavanagh D:** Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**: 629-633, 1997.
- 8) **Chen H, Wurm T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA:** Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J Virol* **76**: 5233-5250, 2002.
- 9) **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.
- 10) **Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D:** Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* **145**: 659-688, 2000.
- 11) **Hiscox JA:** The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. *Virus Res* **95**: 13-22, 2003.
- 12) **Hiscox JA, Wurm T, Wilson L, Britton P, Cavanagh D, Brooks G:** The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *J Virol* **75**: 506-512, 2001.
- 13) **Hoyt CC, Bouchard RJ, Tyler KL:** Novel nuclear herniations induced by nuclear localization of a viral protein. *J Virol* **78**: 6360-6369, 2004.
- 14) **Kang SY, Choi YJ, Yun SI, Song BH, Lee YM:** 5' and 3' *cis*-Acting RNA Elements Required for RNA Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Bacteriol Virol* **37**: 193-201, 2007.
- 15) **Keffaber KK:** Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Practitioners Newsl* **1**: 1-9, 1989.
- 16) **Lee C, Calvert JG, Welch SK, Yoo D:** A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity. *Virology* **331**: 47-62, 2005.
- 17) **Meng XJ:** Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* **74**: 309-329, 2000.
- 18) **Mng XJ, Paul PS, Halbur PG, Lum MA:** Phylogenetic analysis 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 U.S.A. and Europe. *Arch Virol* **140**: 745-755, 1995.
- 19) **Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJ:** 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) **Meulenbergh JJ, Petersen-den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G:** Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* **206**: 155-163, 1995.
- 21) **Molenkamp R, van Tol H, Rozier BC, van der Meer Y, Spaan WJ, Snijder EJ:** The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription. *J Gen Virol* **81**: 2491-2496, 2000.
- 22) **Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* **73**: 270-280, 1999.
- 23) **Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ:** Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **227**: 385-392, 2005.
- 24) **Rodriguez MJ, Sarraseca J, Garcia J, Sanz A, Plana-Duran J, Ignacio Casal J:** Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **78**: 2269-2278, 1997.
- 25) **Rowland RR, Kervin R, Kuckleburg C, Sperlich A, Benfield DA:** The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* **64**: 1-12, 1999.
- 26) **Rowland RR, Schneider P, Fang Y, Wootton S, Yoo D, Benfield DA:** Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* **316**: 135-145,



- 2003.
- 27) **Rowland RR, Yoo D:** Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res* **95**: 23-33, 2003.
  - 28) **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
  - 29) **Schelle B, Karl N, Ludewig B, Siddell SG, Thiel V:** Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol* **79**: 6620-6630, 2005.
  - 30) **Snijder EJ, Meulenberg JJ:** The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* **79**: 961-979, 1998.
  - 31) **Thiel V, Karl N, Schelle B, Disterer P, Klagge I, Siddell SG:** Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. *J Virol* **77**: 9790-9798, 2003.
  - 32) **van Dinten LC, Rensen S, Gorbalenya AE, Snijder EJ:** Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. *J Virol* **73**: 2027-2037, 1999.
  - 33) **Wensvoort G, Tepstra 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, Zestra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong ME, van 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.
  - 34) **Wieringa R, de Vries AA, van der Meulen J, Godeke GJ, Onderwater JJ, van Tol H, Koerten HK, Mommaas AM, Snijder EJ, Rottier PJ:** Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *J Virol* **78**: 13019-13027, 2004.
  - 35) **Wootton S, Yoo D, Rogan D:** Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol* **145**: 2297-2323, 2000.
  - 36) **Wootton SK, Nelson EA, Yoo D:** Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**: 773-779, 1998.
  - 37) **Wootton SK, Rowland RR, Yoo D:** Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nucleocapsid protein. *J Virol* **76**: 10569-10576, 2002.
  - 38) **Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J, Nelson EA:** A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* **287**: 183-191, 2001.
  - 39) **Wurm T, Chen H, Hodgson T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA:** Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol* **75**: 9345-9356, 2001.
  - 40) **Yoo D, Wootton SK, Li G, Song C, Rowland RR:** Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Virol* **77**: 12173-12183, 2003.
  - 41) **Yun SI, Kim SY, Rice CM, Lee YM:** Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J Virol* **77**: 6450-6465, 2003.
  - 42) **Zevenhoven-Dobbe JC, Greve S, van Tol H, Spaan WJ, Snijder EJ:** Rescue of disabled infectious single-cycle (DISC) equine arteritis virus by using complementing cell lines that express minor structural glycoproteins. *J Gen Virol* **85**: 3709-3714, 2004.