Journal of Bacteriology and Virology 2006. Vol. 36, No. 2 p.79 – 87

서울지역에서 분리한 사람 로타바이러스 비 구조단백 NSP4의 유전적 변이

중앙대학교 의과대학 미생물학교실[1], 소아과학교실[2]

조성림[1] · 안장훈[1] · 김기정[1] · 정상인[1] · 임인석[2] · 김원용[1*]

Genetic Variation in the NSP4 Gene of Human Rotavirus Isolated in Seoul

Sung-Lim Cho[1], Jang-Hoon Ahn[1], Kijeong Kim[1], Sang-In Chung[1], Inseok Lim[2] and Wonyong Kim[1*]

[1]Department of Microbiology, [2]Department of Pediatrics, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-756, Korea

Received : March 20, 2006
Accepted : May 11, 2006

The nonstructural protein 4 (NSP4) of rotavirus encoded by gene 10, plays an important role in rotavirus pathogenicity. In this study, NSP4 gene sequences of human rotaviruses circulating in Seoul, Korea between March 2004 and April 2005 were determined. The nucleotide sequence data indicated that the NSP4 genes of human rotavirus Korean isolates were 750 or 751 bases in length and encoded one open reading frame of 175 amino acids with two glycosylation sites. The NSP4 of Korean isolates exhibited amino acid sequence homologies between 59.4% and 98.9%. The NSP4 of CAU4 and CAU15 showed a high degree of amino acid sequence homologies with NSP4 genotype A viruses, but the NSP4 of CAU5, CAU6, CAU11, CAU14, CAU16 and CAU22 exhibited a high degree of amino acid sequence homologies with NSP4 genotype B viruses. Interestingly, CAU3 and CAU7 showed low degree of amino acid sequence homology with those of currently described NSP4 genotypes A to D and belonged a distinct lineage on the phylogenetic tree. These findings suggests that distinct NSP4 type was circulating among human rotavirus strains in the local community of Seoul and raising intriguing questions regarding possible explanations for new genotype.

Key Words: Rotavirus, NSP4, Genetic diversity

서 론

로타바이러스 (Rotavirus)는 영·유아 설사의 가장 흔한 원인체이다 (17). 미국 질병관리본부의 보고에 의하면 세계적으로 매년 1억 1천 1백만 명이 로타바이러스에 감염되어 44만 명의 5세 이하 영·유아가 사망한다고 하였으며, 미국에서도 소요되는 의료비만도 1년에 1천만 달러에 이르고 있다. 따라서 세계보건기구는 로타바이러스 발생감소와 백신개발을 최우선 연구과제로 지정하고 있다 (5). 국내에서도 로타바이러스는 급성 장염으로 종합병원에 입원하는 영·유아 환자의 70%의 원인체로 보고 되고 있다 (6).

*Reoviridae*과에 속하는 로타바이러스는 피막이 없는 직경 75 nm의 정이십면체 형태로 외부 캡시드, 내부 캡시드 및 핵심 등 3겹의 캡시드 단백으로 구성되어 있다 (9). 게놈은 11개 분절의 dsRNA로서 구성되며 각각의 분절은 6개의 구조단백 (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 5개의 비 구조단백 (NSP1~5)을 지배한다 (8,9).

로타바이러스에 의한 설사는 보통 장 상피세포의 파괴로 인한 이차적인 흡수불량과 상피세포 간 세포액 균형 변화 그리고 국소적인 융모성 허혈 등에 의해 유도된다고 알려져 왔다. 그러나 최근 비 구조단백 중의 하나인 NSP4가 로타바이러스의 병원성에 중요한 역할을 한다는 것이 보고 되었다 (16,18). NSP4는 세균의 장관독소처럼 장관 내에 존재하는 특이 수용체와 결합하여 cAMP 또는 cGMP를 증가시키고

*교신저자: 김원용. 156-756 서울특별시 동작구 흑석동 221, 중앙대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 02-820-5685, Fax: 02-812-5495
e-mail: kimwy@cau.ac.kr

cyclic nucleotide 신호 전달경로를 활성화하여 Cl^-의 분비를 증가시키는 반면 Na^+와 물의 흡수는 감소시키는 기전으로 설사를 일으킨다. 특히 순수 분리한 NSP4 또는 *in vitro*에서 합성된 22개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 (114~135 aa)는 6~10일령 마우스에서 설사를 유발한다 (2). 이와 같이 NSP4는 로타바이러스 감염에서 중요한 역할을 하고 있지만 아직 우리나라에서는 사람 로타바이러스 NSP4 유전자형에 대한 체계적인 보고가 거의 없다.

본 연구에서는 중앙대학교 용산병원에 급성 위장관염으로 내원한 환아에서 검출된 로타바이러스를 대상으로 NSP4 유전자의 염기서열을 분석하고 유전적 다양성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 분변 시료

2004년 3월부터 2005년 4월까지 중앙대학교 용산병원 소아과에 급성 위장관염으로 입원한 환아의 분변을 대상으로 SERODIRECT Rota kit (Eiken, Tokyo, Japan)를 이용한 역수동 적혈구응집반응으로 로타바이러스 항원의 존재 유무를 조사하였다.

2. 바이러스 RNA 분리

바이러스 RNA의 분리는 로타바이러스 양성 분변 시료로부터 TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 실시하였다. 분리한 RNA는 DEPC water에 용해하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. G 혈청형과 P 유전자형 분석

로타바이러스 G형 분석은 Gouvea 등 (11)의 방법에 따라 RT-PCR과 일련의 multiplex PCR로 수행하였다.

4. RT-PCR에 의한 NSP4 유전자 증폭

로타바이러스의 NSP4 유전자 증폭을 위한 sense primer (5'-GGCTTTTAAAAGTTCTGTTC-3')와 antisense primer (5'-GGTCACACTAAGACCATTCC-3')는 사람 로타바이러스 Wa의 염기서열 (AF093199)을 기초로 750 bp 크기의 NSP4 유전자 전체를 증폭할 수 있도록 제작하였으며 (주)제노텍 (Taejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

NSP4 유전자는 분리한 50 ng의 로타바이러스 RNA에 7% dimethyl sulfoxide를 가하여 100℃에서 5분간 변성시킨 다음 10 x Taq buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 μM forward primer, 1 μM reverse primer 및 4 U AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)와 2.5 U Taq polymerase (Promega)를 가하여 DNA thermal cycler (Model 480, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 42℃에서 30분간 반응하여 first strand cDNA를 합성한 후 94℃에서 45초, 43℃에서 45초, 72℃에서 1분 반응을 25회 반복한 다음 마지막으로 72℃에서 7분간 반응하여 증폭하였다. 증폭한 PCR 산물은 전기 영동하여 크기와 증폭 유무를 관찰하였다.

5. NSP4 유전자 염기서열 분석

국내 환자들로부터 검출된 로타바이러스 CAU3, CAU4, CAU5, CAU6, CAU7, CAU11, CAU14, CAU15, CAU16 및 CAU22의 NSP4 PCR 반응산물은 pGEM® T easy vector system (Promega)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 클로닝 하고 BigDye Terminatior Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 NSP4 유전자 염기서열은 Lazergene software (DNASTAR Inc., Milwaukee, WI, USA)를 이용하여 아미노산으로 번역한 후 Clustal_X (1.7) program (15)을 이용하여 미국 NCBI GenBank에 등록된 외국 로타바이러스 Wa (AF093199 Human; G1), DS-1 (AF174305 Human; G2), AU1 (D89873 Human; G3), SA11 (AF087678 Simian; G3), H-2 (AF14480 Equine; G3), BAP-2 (AF144795 Lapine; G3), CU-1 (AF144806 Canine; G3), FRV64 (D88833 Feline; G3), EW (AB003805 Murine; G3), EHP (U96336 Murine; G3), ST3 (U59110 Human; G4), OSU (D88831 Porcine; G5), UK (M21885 Bovine, G6), AU32 (D88830 Human; G9), B223 (AF144805 Bovine; G10), YM (X69485 Porcine; G11) 및 L26 (AJ311732 Human; G12)들의 NSP4 아미노산서열과 다중 정렬하여 유사성 행렬을 구하였다. 다중 정렬한 아미노산 서열은 PHYLIP package (10)를 이용하여 계통수를 작성하였다. Unrooted tree는 neighbour-joining algorithm (14)을 이용하여 추론하였으며, 진화적 거리 행렬은 Jukes와 Cantor (12)의 distance model을 이용하여 계산하였다. 작성한 tree의 위상은 PHYLIP package의 SEQBOOT과 CONSENSE option을 이용하여 neighbour-joining method의 1,000회 resampling을 통한 bootstrap 분석으로 평가하였다.

결 과

1. 로타바이러스 G 혈청형과 P 유전자형

10례의 국내 검출 사람 로타바이러스의 G 혈청형과 P 유전자형을 조사한 결과는 Table 1과 같다. G 혈청형 분석결과 G1은 CAU11과 CAU15, G2는 CAU4과 CAU6, G3는 CAU3, CAU7과 CAU16, G4는 CAU5와 CAU14 그리고 G9은 CAU-22로 나타났다. P 유전자형 분석결과 P[4]는 CAU4, P[6]은 CAU6, CAU14 및 CAU16, P[9]는 CAU5 그리고 CAU3, CAU-

Table 1. Combination of G, P and NSP4 genotype of rotavirus Korean isolates

	G type	P type	NSP4 type
CAU3	3	NT	E
CAU4	2	4	A
CAU5	4	9	A
CAU6	2	6	B
CAU7	3	NT	E
CAU11	1	NT	B
CAU14	4	6	B
CAU15	1	NT	B
CAU16	3	6	B
CAU22	9	NT	B

[a] NT, not typeable

7, CAU11, CAU15 및 CAU22는 형을 결정할 수 없었다.

2. NSP4 유전자 아미노산서열 분석

국내 환자로부터 검출된 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열을 분석한 결과 CAU3, CAU5, CAU6, CAU7, CAU11, CAU14 및 CAU22는 750개의 염기를 가지고 있었으나 CAU-4, CAU15 및 CAU16는 751개의 염기로 구성되어 있었다. NSP4 유전자들은 모두 175개의 아미노산을 코딩하는 1개의 open reading frame을 가지고 있었으며 2 부위 (63~71 nt, 93~101 nt)의 glycosylation site가 존재하였다. NSP4 단백의 N 말단부위, VP4 결합부위 (VP4-binding region: 112~148 aa) 및 double-layered particle 결합부위 (DLP-binding region: 161~175 aa)에서는 각 바이러스 간 아미노산서열의 상이한 부분이 많이 관찰되었으며, 소수성 도메인 H2와 H3 부위에서는 상이한 부분이 적어 아미노산서열이 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

국내 로타바이러스 NSP4의 아미노산서열을 GenBank에 보고 된 외국 로타바이러스 NSP4와 다중 정렬하여 비교한 결과 국내 로타바이러스 NSP4 아미노산서열 상동성의 범위는 59.4~98.9%로 나타났다. 가장 낮은 상동성은 CAU3과 CAU4 사이에서 나타난 59.4%이었으며, CAU11과 CAU22에서는 가장 높은 98.9%의 상동성이 관찰되었다. 가장 높은 상동성은 CAU3과 CAU7에서는 관찰된 96.0%로 나타났다. 외국 대표 로타바이러스들과의 비교한 결과 유전자형 B 그룹에 속하는 대표적인 사람 로타바이러스 Wa와 CAU5, CAU6 및 CAU14는 99.4%, CAU11은 97.1%, CAU22는 96.0% 그리고 CAU16은 90.9%의 높은 상동성을 보였다. 유전자형 A 그룹에서는 가장 높은 상동성이 DS-1는 CAU4와의 96.0%, H-2는 CAU15와의 91.4%로 나타났다. 반면 CAU3와 CAU7은 외국유래 사람 로타바이러스들과 모두 70% 이하의 낮은 상동성을 보였다.

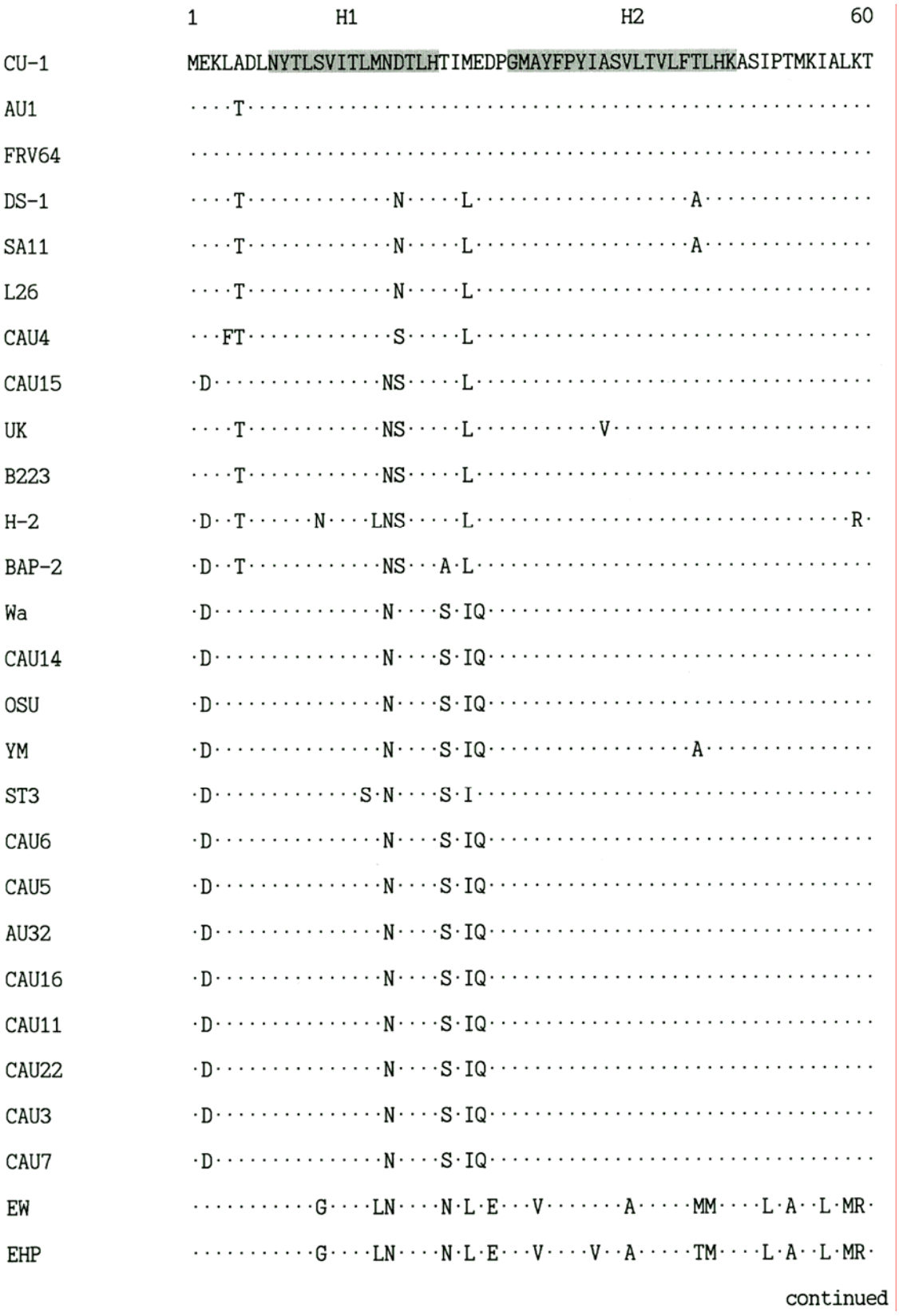
3. NSP4 유전자 계통수 분석

국내 로타바이러스와 외국 분리주의 NSP4에 대한 유전적 상관성을 조사하기 위하여 작성한 계통수는 Fig. 2와 같다. 국내 로타바이러스들은 크게 3 그룹으로 분류되었다. CAU4와 CAU15는 유전자형 A로 분류되었으며, CAU5, CAU6, CAU11, CAU14, CAU16 및 CAU22는 유전자형 B에 속하였다. 반면, 특이하게도 CAU3과 CAU7은 기존에 알려진 A, B, C 및 D 유전자형과는 다른 신규의 독립그룹을 형성하였다. 국내 검출 로타바이러스 간에는 CAU4와 CAU15는 사람 G2 혈청형 DS-1, 원숭이 G3 혈청형 SA11 및 사람 G12 혈청형 L26 등과 밀접한 연관성을 보였으며, CAU5, CAU6 및 CAU14는 G1 혈청형인 사람 로타바이러스인 Wa와 가장 유전적인 근연관계를 보였다. CAU11, CAU16 및 CAU22는 사람 G9 혈청형 AU32와 연관성이 있었다. CAU3과 CAU7은 서로 같은 그룹을 형성하였으나 현재까지 보고 된 어떠한 외국 로타바이러스들과도 유사성이 관찰되지 않았다.

고 찰

로타바이러스 NSP4는 현재 세계적으로 A, B 및 C의 3개의 유전자형이 존재한다고 보고 되고 있다 (13). 유전자형 A는 751개의 염기로 구성되고 서로간의 상동성이 91% 이상으로 G2 혈청형의 사람 로타바이러스인 RV5, S2, 1076, E201, E210과 G3 혈청형의 원숭이 로타바이러스인 SA11 및 G6 혈청형의 소 로타바이러스인 UK 등이 여기에 속한다. 유전자형 B는 750개의 염기로 구성되고 상호간 상동성이 93% 이상으로 사람 로타바이러스인 Wa (G1), ST3 (G4), AU32 (G9)와 돼지 로타바이러스 OSU (G5), YM (G11) 등이 여기에 속한다. 원숭이 로타바이러스인 RRV (G3), 고양이 로타바이러스 (G3) 등은 유전자형 A와 같이 751개의 염기로 구성되지만 염기서열 상동성이 81~85%밖에 되지 않아 NSP4 유전자형 C로 구별되며, 쥐 로타바이러스는 사람 및 동물 로타바이러스와 비교할 때 60~65%의 낮은 상동성을 보여 유전자형인 NSP4 유전자형 D로 분류되고 있다 (3,7).

국내에서 검출된 사람 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열을 분석한 결과 NSP4 유전자는 750개의 염기 (CAU3-G3, CAU5-G4, CAU6-G2, CAU7-G3, CAU11-G1, CAU14-G4, CAU22-G9) 또는 751개의 염기 (CAU4-G2, CAU15-G1, CAU16-G3)로 구성되어 있었다. 이러한 결과는 G1, G3, G4 혈청형에 속하는 로타바이러스의 NSP4 유전자의 협기가 751


1 H1 H2 60
CU-1 MEKLADLNYTLSVITLMNDTLHTIMEDPGMAYFPYIASVLTVLFTLHKASIPTMKIALKT
AU1 ····T·····
FRV64 ·····
DS-1 ····T·····N·····L·····A·····
SA11 ····T·····N·····L·····A·····
L26 ····T·····N·····L·····
CAU4 ···FT·····S·····L·····
CAU15 ·D·····NS·····L·····
UK ····T·····NS·····L·····V·····
B223 ····T·····NS·····L·····
H-2 ·D··T·····N····LNS·····L·····R·
BAP-2 ·D··T·····NS···A·L·····
Wa ·D·····N····S·IQ·····
CAU14 ·D·····N····S·IQ·····
OSU ·D·····N····S·IQ·····
YM ·D·····N····S·IQ·····A·····
ST3 ·D·····S·N····S·I·····
CAU6 ·D·····N····S·IQ·····
CAU5 ·D·····N····S·IQ·····
AU32 ·D·····N····S·IQ·····
CAU16 ·D·····N····S·IQ·····
CAU11 ·D·····N····S·IQ·····
CAU22 ·D·····N····S·IQ·····
CAU3 ·D·····N····S·IQ·····
CAU7 ·D·····N····S·IQ·····
EW ·····G····LN····N·L·E···V·····A·····MM····L·A··L·MR·
EHP ·····G····LN····N·L·E···V····V··A·····TM····L·A··L·MR·

continued

	61 H3 120
CU-1	SRCSYKVIKYCIVSVFNTLLKLAGYKEQITTKDEIEKQMDRVVKEMRRQLEMIDKLTTRE
AU1	··············I···
FRV64	··············I···
DS-1	·K·····V·····TI···
SA11	·K·····V·····TI···
L26	·K·····V·····TI······I······································
CAU4	·K·····V·····TIL··
CAU15	·K·····V·····TIL··
UK	·K·····V·····TI···
B223	·K·····V·····TI························E········HFK·········
H-2	·K···········TI·································H···········
BAP-2	·R···········TI·····················R······R················
Wa	·K···········TII············V·······Q····I··················
CAU14	·K···········TII············V·······Q····I···········N······
OSU	·K·········M·TII············V·······Q····II·················
YM	·K·········M·TII············V·······Q····I·······PR·········
ST3	·K·········VVTII············V·······Q····I··················
CAU6	·K···········TII············V·······Q····I··················
CAU5	·K········CIVTII············V·······Q····I··················
AU32	·K·······C···TII············V·······Q····I··················
CAU16	·K·····LNIVLS·SLILF·········V·······Q····I··················
CAU11	·K···········TIV············V·······Q····I··················
CAU22	·K······R····TIV············V·······Q····I··················
CAU3	·K···········TIV··PF·IGWI·RTGYY·RRNGATDGQNC·RDETSAGDDR·FNYSL
CAU7	·K···········TIV···F·IGWI·RAGHY·RRNGATDGQNC·RDETSAGDDR·INYSL
EW	·Q···RI··RVV·TLI····RLG··NDYL·D···TE··IN·V···L·Q··A··E······
EHP	·Q···RI··RVV·TLI····R·G··NDYL·D···TE··IN·V···L·Q··T··E······

continued

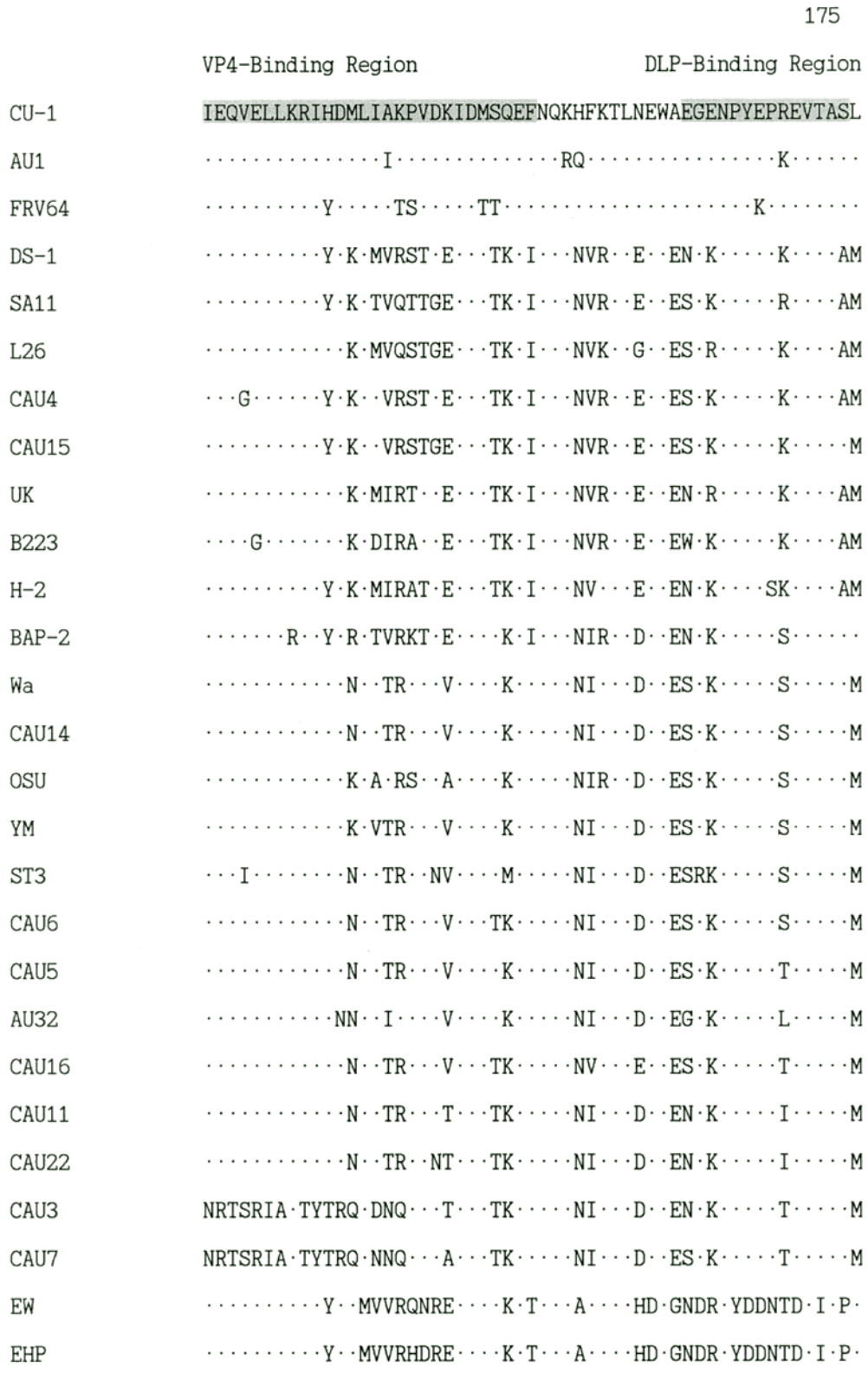


Figure 1. Comparison of the deduced amino acid sequences of the NSP4 gene of rotavirus Korean isolates and representative foreign rotaviruses. The hydrophobic domains are indicated as H1, H2, H3. The NSP4 amino acid sequences of foreign rotaviruses were obtained from GenBank database.

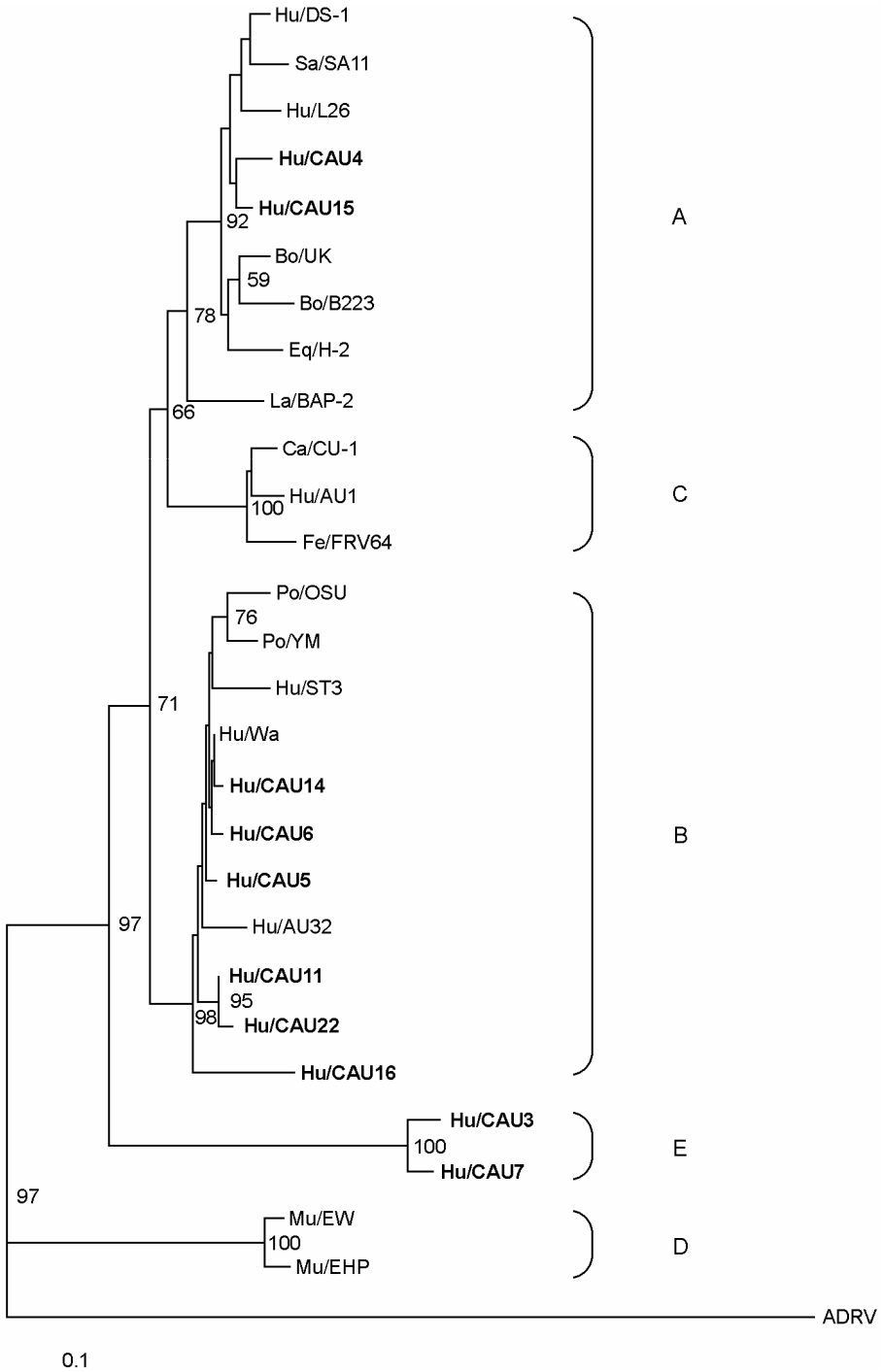


Figure 2. Neighbour-joining tree based on NSP4 gene of rotavirus Korean isolates and representative foreign rotaviruses. The numbers at the nodes indicate the level of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 1,000 resampled datasets; only values above 50% are given. The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

개로 구성되어 있는 반면 G2 혈청형 로타바이러스의 NSP4 유전자는 750개의 염기로 구성되어 있다는 기존의 보고와는 차이점을 보여 앞으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각 된다. 그러나 NSP4 유전자형이 G 혈청형과는 상관성이 없다는 보고와는 일치하는 결과를 보였다. 또한 국내 사람 로타바이러스의 NSP4는 모두 175개의 아미노산을 지배하는 1개

의 open reading frame과 2개의 당화 부위가 존재하여 이는 Zang 등 (18)의 보고와 일치하였다.

국내에서 검출된 사람 로타바이러스들의 NSP4 아미노산 서열을 대표적인 외국 로타바이러스들과 다중 정렬한 결과, 상이부위는 N 말단부위, VP4 결합부위 (112~148 aa)와 DLP 결합부위 (161~175 aa)에 집중되어 있었으며 hydrophobic domain인 H1 (7~21 aa), H2 (28~47 aa) 및 H3 (67~85 aa)에서는 차이가 별로 나타나지 않아 매우 보전적인 부위임을 알 수 있었다.

VP4 결합부위에서의 아미노산서열의 차이는 이 부위에서 일어나는 VP4와 NSP4 간의 상호작용에 기인하는 것으로 알려지고 있다 (1). 또한 이 부위는 로타바이러스의 병원성에 관련되어 있는 부분인 114~135 aa 부위를 포함하고 있기 때문에 변이가 발생하는 것으로 추론되고 있다 (4,18). 아미노산서열의 차이가 집중된 N 말단부위는 NSP4 단백이 소포체에 부착하는 과정에 작용하는 hydrophobic domain H1을 포함하는 것으로 알려지고 있으며 transmembrane domain과 cytoplasm-binding domain으로 기능적으로 중요하다고 알려져 있는 H2와 H3는 사람 로타바이러스 간에는 비교적 아미노산서열이 잘 보존되어 있는 것으로 확인되었다 (Bergmann 등, 1989).

국내 로타바이러스들은 기존에 보고 된 NSP4 유전자형 A (CAU4, CAU15)와 유전자형 B (CAU5, CAU6, CAU11, CAU-14, CAU16, CAU22)에 속하였다 (7,13). 그러나 특이하게도 CAU3과 CAU7은 현재까지 알려진 어느 그룹에 모두 속하지 않아 새로운 NSP4 유전자형의 바이러스임이 규명되었다.

이 연구에서 실험한 시료들은 2004년 3월부터 2005년 4월까지 서울지역에서 국한된 지역에서만 수집되었으므로 국내 로타바이러스의 NSP4 유전자의 분자역학적인 예로서 설명하기에는 부족함이 있다. 그러나 현재까지 보고 되지 않은 새로운 유전자형이 검출되었으므로 지속적인 규명과 아울러 병원성과 관련된 특성을 규명하기 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비 (일반연구비) 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

1) **Au KS, Mattion NM, Estes MK:** A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* **194:** 665-673, 1993.

2) **Ball JM, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK:** Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272:** 101-104, 1996.

3) **Ballard A, McCrae MA, Desselberger U:** Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses. *J Gen Virol* **73:** 633-638, 1992.

4) **Bergmann CC, Maass D, Pourchynsky MS:** Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein in NS28 in the rough endoplasmic reticulum. *EMBO J* **8:** 1695-1703, 1989.

5) **Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kang JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen KT, Jiraphongsa C, Ponguswanna Y, Nguyen VM, Phan VT, Le TL, Hummelman E, Gentsch JR, Glass R:** First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* **10:** 988-995, 2004.

6) **CDMR:** Viral Agents of Gastroenteritis in 2003. http://dis.mohw.go.kr/cdmr/cdmr_view.asp, 2004.

7) **Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK:** Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analysis of animal rotaviruses. *Arch Virol* **145:** 371-383, 2000.

8) **Estes MK:** Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 174 **(Suppl. 1):** S37-S46, 1996.

9) **Estes MK, Cohen J:** Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53:** 410-449, 1989.

10) **Felsenstein J:** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) vession 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.

11) **Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N:** Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* **32:** 1408-1409, 1994.

12) **Jukes TH, Cantor CR:** Evolution of protein molecules. pp. 21-132. In Mammalian Protein Metabolism, volume 3. Munro HN (Ed), Academic Press Inc, New York, 1969.

13) **Kirwood CD, Palombo EA:** Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* **236:** 258-265, 1997.

14) **Saitou N, Nei M:** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mole Biol Evol* **4:** 406-425, 1987.

15) **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG:** The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality

analysis tool. *Nucleic Acid Res* **24:** 4876-4882, 1997.

16) **Tian P, Ball JM, Zeng CQY, Estes MK:** The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* **70:** 6973-6981, 1996.

17) **World Health Organization:** Rotavirus vaccine. *WHO WER* **74:** 33-38, 1999.

18) **Zang M, Zeng CQY, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK:** Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* **72:** 3666-3672, 1998.