

G9 혈청형 사람 로타바이러스 분리 및 특성

충북대학교 수의과대학¹, 국립보건원 질병관리센터 간염폴리오연구팀²

이강범¹ · 김진원¹ · 이선희² · 천두성² · 지영미² · 강신영^{1*}

Isolation and Characterization of G9 Human Rotaviruses

Kang-Bum Lee¹, Jin-Won Kim¹, Sun-Wha Lee², Doo-Sung Cheon²,
Young-Mee Jee² and Shien-Young Kang^{1*}

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

²Division of Viral Hepatitis and Poliovirus, Center for infectious Disease,
National Institute of Health, Seoul, Republic of Korea

Received : November 21, 2007

Accepted : December 20, 2007

Group A rotaviruses are the most common causes of gastroenteritis among infants and young children. The outer capsid layer of the virus is composed of two structural proteins, VP4 and VP7, and they play important roles in protection by eliciting neutralization antibodies. Group A rotaviruses are subdivided into distinct G and P serotypes according to the antigenic differences of the VP7 and VP4, respectively. Rotavirus G9 serotype was thought to be the fifth most common serotype circulating among the population worldwide. In this study, G9 human rotaviruses (HRV) were isolated from fecal samples using MA104 cells and characterized. Characteristic cytopathic effects of rotavirus were observed and rotaviral antigens were confirmed by indirect immunofluorescence antibody test in MA104 cells inoculated with isolated HRV strains. The nucleotide sequences of the VP7 gene of Korean G9 HRV isolated in this study were determined and compared with those of other recent and prototype G9 rotavirus strains from other parts of the world. Also, the nucleotide sequences of VP4 and NSP4 gene of Korean G9 HRV were determined and compared with those of other rotavirus strains from other countries. The results showed that the Korean HRV isolates belong to a G9, P[8] and NSP4 B genotype. The Korean G9 HRV isolates and their nucleotide sequence data would be usefully applied for the vaccine development of HRV in the near future.

Key Words: G9 Rotavirus, VP4, VP7, NSP4

서 론

로타바이러스는 *Reoviridae*에 속하는 직경 70 nm 정도의 정이십면체 형태의 바이러스로 triple-layered capsid를 가지며 core에 11개의 분절로 되어 있는 이중가닥 RNA

(dsRNA)로 구성된 바이러스 유전자를 가지고 있다. 11개의 분절로 된 로타바이러스 유전자는 6개의 구조단백질(VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)과 6개의 비구조단백질(NSP1-NSP6)을 암호화하고 있다 (7,8,20). 로타바이러스의 구조단백질 중 VP6는 안쪽 capsid를 구성하는 41 KDa 크기의 중요한 단백질로 전체 바이러스 입자의 51%를 차지하고, core capsid 단백질 VP2와 바깥쪽 capsid 단백질 VP4와 VP7과 상호작용하며 모든 로타바이러스 주들이 공통적으로 가지고 있는 항원부위를 가지고 있기 때문에 항원 검출을 목적으로 하는 진단에 주로 사용되고 있다. VP4는 88 KDa 크기의 바깥쪽 capsid 단백질로 바

*교신저자: 강신영. 361-763, 충북 청주시 흥덕구 성봉로 410, 충북대학교 수의과대학 바이러스학교실
Phone: +82-43-261-2598, Fax: +82-43-267-3150,
e-mail: sykang@chungbuk.ac.kr

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

이러스 입자의 1.5%를 차지하며 세포배양에서 단백질 가수분해효소의 처리에 의하여 감염력이 증가되는데, 이는 바깥쪽 capsid에 존재하는 spike인 VP4 단백질이 단백질 분해효소에 의해 VP8 (28 KDa)과 VP5 (60 KDa)로 분리되어야 숙주세포에 부착되어 침투될 수 있기 때문이다. VP7은 분자량 30 KDa의 바깥쪽 capsid의 표면을 구성하는 당단백질로 바이러스 입자 단백질의 30%를 차지하며 VP4와 함께 중화항체형성에 관여하여 로타바이러스 감염에 있어서 방어에 중요한 역할을 한다. 로타바이러스 유전자에는 복제와 형태형성에 사용되는 6개의 비구조단백질을 암호화하고 있으며 NSP4를 제외한 비구조단백질은 핵산과 서로 상호작용을 하여 RNA 복제, 전사, 조립 및 packaging을 위한 tRNAs 또는 chaperone 기능을 하는 것으로 추측된다 (6,21,25,27). NSP4는 RNA와 결합하지 않고 소포체 내로 이동하여 조립을 돕는 세포 내 수용체로서 형태형성에 중요한 역할을 하며 최근에는 calcium-dependent signal transduction pathway를 통해 chloride 분비를 유도하는 장독소의 역할을 한다고 알려졌다 (31).

로타바이러스는 capsid 단백질의 항원성에 따라 군 (group), 아군 (subgroup) 그리고 혈청형 (serotype)으로 분류된다 (8,20). 로타바이러스 군은 혈청학적 방법에 의하여 교차반응이 있는 항원인 VP6에 의해 7개의 군 (A-G)으로 분류되며, 사람에서는 A, B 그리고 C군이 보고되고 있으나 대부분의 로타바이러스성 설사는 A군에 의하여 일어난다 (20,32). 또한, 로타바이러스의 바깥 capsid를 구성하고 있는 단백질인 VP7과 VP4의 항원성에 따라서 각각 G형과 P형으로 구분된다. 로타바이러스 분류는 VP4에 의한 P형 (protease-sensitive protein)과 VP7에 의한 G형 (glycoprotein)의 이원체계가 사용되며 (11,13,14), 현재 16개의 VP7 혈청형과 적어도 27개의 VP4 유전자형 (genotype)이 보고되어 있다 (20).

로타바이러스 감염은 주로 6~24개월 영아에서 많이 발생하고, 전 세계적으로 발생한다. 우리나라와 같은 온대지방에서는 사계절 내내 환자가 발생할 수 있으나 겨울철에 흔히 유행한다. 질병관리본부의 집계에 따르면 2001년에서 2003년까지의 국립보건연구원과 각 시·도 보건환경연구원에서 검사된 44,603건의 설사 검체 중 8,346건 (18.7%)이 바이러스 감염으로 인한 설사로 확인되었고 그 중 6,675건 (80.0%)이 로타바이러스에 의한 감염으로 확인되었다. 로타바이러스에 의한 감염에서 P형

과 G형의 조합 중 가장 유행한 것은 P1B[4]/G2, P1A[8]/G1, P2A[6]/G4, P1B[4]/G1 순으로 검출되었다. 이러한 양상은 전 세계적인 P/G형 검출양상과 일치하였다 (3). 또한 G1-G4 이외에도 G9 같은 새로운 혈청형이 인도에서 1980년 이후로 많이 분리되었고 1995년 이후에는 선진국을 포함하여 전 세계적으로 분리되고 있다.

본 연구의 목적은 최근 미국 등 선진국에서 주요한 혈청형으로 보고된 바 있는 G9형 사람 로타바이러스를 MA104 세포를 이용하여 순수 분리한 후, 분리된 G9형 로타바이러스의 분자생물학적 특성을 규명하고 외국에서 검출된 동일 혈청형의 로타바이러스와의 유전자 비교분석을 통해 국내 분리 로타바이러스의 분자역학적 자료 확보 및 차후 G9형의 로타바이러스의 유행에 대비하여 백신주를 확보하는데 있다.

재료 및 방법

1. 로타바이러스 분리 및 확인

G9 혈청형 로타바이러스를 순수 분리하기 위하여 2003년 전국 시·도 보건환경연구원과 질병관리본부에서 급성장염의 증상을 나타낸 어린 아이의 설사 분변 중 rotavirus genotyping을 수행하여 잠정적으로 G9 혈청형으로 확인된 3개의 분변재료를 실험에 사용하였다.

로타바이러스는 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포를 5% 소태아혈청 (Fetal bovine serum; FBS)과 penicillin-streptomycin이 첨가된 α -minimum essential medium (α -MEM)을 사용하여 배양하여 Kang 등 (19)과 Sato 등 (30)의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 즉, 설사 분변을 α -MEM으로 10% (w/v) 되도록 희석한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심하고 상층액을 0.2 μ m syringe filter로 여과하였다. 여과한 가검물을 배양세포에 접종하기 전에 monolayer가 형성된 MA104 세포는 배양액을 제거하고 혈청이 들어있지 않은 α -MEM으로 3회 세척하였으며, 여과한 분변재료는 trypsin (Sigma, St. Louis, MO, USA)의 최종농도가 10 μ g/ml이 되도록 하여 37°C에서 30분 반응시켰다. 이와 같이 trypsin으로 처리한 분변재료를 MA104 세포에 접종하고 37°C에서 1시간 흡착한 다음, 혈청이 들어있지 않은 α -MEM으로 1회 세척하고, 1.0 μ g/ml의 trypsin이 함유된 α -MEM을 첨가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 회전배양기를 이용하여 7일간 배양하였다. 배양 7일 동안 세포병변효과 (cytopathic effect; CPE)가 나타나는지

를 관찰하고 CPE가 나타나지 않을 경우에는 감염세포를 3회 얼리고 녹이는 과정을 반복한 후 위와 같은 방법으로 CPE가 나타날 때까지 계대배양하였다. CPE가 나타난 감염세포에서는 plaque assay법을 3회 반복하여 로타바이러스를 순수하게 분리하였다.

Plaque assay법으로 순수 분리한 바이러스는 전자현미경 관찰 (19), 로타바이러스 특이 단클론항체를 이용한 간접형광항체법 (18) 그리고 RNA electropherotyping법 (12)으로 확인하였다.

2. 로타바이러스의 분자생물학적 특성

1) Primer 제조

로타바이러스의 VP4, VP7 및 NSP4 유전자 분석을 위한 primer들은 Gentsch 등 (9), Gouvea 등 (10) 그리고 Ciarlet 등 (5)의 방법에 따라 제작하였다.

2) RNA 추출

Viral RNA 추출은 Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 분리하였다. 먼저 바이러스 감염 조직배양액 200 μ l에 Tri-reagent 600 μ l를 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후, chloroform 200 μ l를 첨가하여 진탕하고 상온에서 15분간 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 무색의 상층액을 분리하여 새로운 microtube에 옮기고 동량의 2-propanol을 첨가하여 진탕하고 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 침전물을 DEPC (Diethylpyrocarbonate, Sigma)가 첨가된 70% ethanol로 세척하여 상온에서 건조시켰다. 침전물을 30 μ l의 DEPC로 처리한 증류수로 현탁시킨 후 VP4, VP7 및 NSP4 유전자 분석을 위한 template로 사용하였다.

3) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

추출한 viral RNA를 주형으로 2.5 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 3 μ l, 10 \times PCR buffer (Invitrogen) 2.5 μ l, MMLV RNA reverse transcriptase (Invitrogen) 200 U 0.5 μ l, random primer (Promega, Madison, WI, USA) 0.25 μ l, RNA 시료 10 μ l와 함께 총량 25 μ l의 RT reaction mixture를 만들고, 20 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분 그리고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 합성된 cDNA는 VP4, VP7 및 NSP4 유전자 증폭을 위해 사용하였다.

VP4 유전자를 증폭하기 위하여 합성된 cDNA를 사용하여 2.5 mM dNTP 5 μ l, 5 \times PCR buffer A (Invitrogen) 5 μ l,

5 \times PCR buffer B (Invitrogen) 5 μ l, 10 pM의 VP4-1a (5'-GGCTATAAAATGGCTTCGCT-3')와 VP4-1b (5'-GGTCAC-ATCCTCGATGAGTT-3') primer들을 각각 2 μ l씩 첨가하고, elongase enzyme mix (Invitrogen) 1 μ l, cDNA 5 μ l와 함께 총 50 μ l의 PCR mixture로 하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 68 $^{\circ}$ C에서 3.5분 반응을 35회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension 시켰다.

VP7 및 NSP4 유전자를 증폭하기 위하여 합성된 cDNA를 사용하여 2.5 mM dNTP 2 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 50 mM MgCl₂ (Bioneer, Daejeon, Korea) 1 μ l, 10 pM의 Beg-9 (5'-GGCTTTAAAGAGAGAATTTCCTGCTGG-3')와 End-9 primer (5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCT-AAG-3')들을 각각 1 μ l씩 첨가하고, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.2 μ l, cDNA 2.5 μ l와 함께 총 25 μ l의 VP7 PCR mixture로 하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 42 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 반응을 35회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension 시켰다. NSP4 유전자의 경우 Beg-9과 End-9 primer 대신 동량의 NSP4-F (5'-GGCTTTTAAAG-TTCTGTTCGAG-3')와 NSP4-R primer (5'-GGTCACACT-AAGACCATTCC-3')들을 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 48 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 반응을 35회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension 시켰다. 증폭한 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 증폭유무를 확인하였다.

4) 유전자 염기서열 분석

국내 분리 로타바이러스의 VP7, VP4 그리고 NSP4 PCR 반응산물은 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하고 ABI PRISM BigDye terminator Cycle Sequencing Reaction kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 96 $^{\circ}$ C에서 1초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분 동안 25회 반복하여 반응시켰다. 반응 후 반응산물을 3 M sodium acetate (pH 5.8)와 ethanol로 침전시킨 후 자동 염기서열분석기 (ABI PRISMTM 3100, Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하고, 결정된 염기서열은 Lasergene software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)에 포함된 Editseq와 Seqman 프로그램을 이용하여 각각의 염기서열에 대한 교정 작업을 실시하였다. 확인된 염기서열 자료들은 Treeview (version 1.66) 프로그램을 이용하여 계통분석을 실시하였으며, 진화적 거리 행렬은 Lasergene에 포함된 MegAlign의 sequence distance를 이용하여 계산

하였다. 작성한 tree의 위상은 Clustal_X (1.81)의 tree option을 이용하여 neighbour-joining method의 1,000회 resampling을 통한 bootstrap 분석으로 평가하였다.

국내에서 분리된 로타바이러스 (KNIH-7, KNIH-9 그리

고 KNIH-13)의 VP7, V4 및 NSP4의 유전자 염기서열은 Clustal_X (1.81) program을 이용하여 미국 NCBI GenBank에 등록된 유전자 염기서열들과 다중 정렬하여 유사성 행렬을 구하였다.

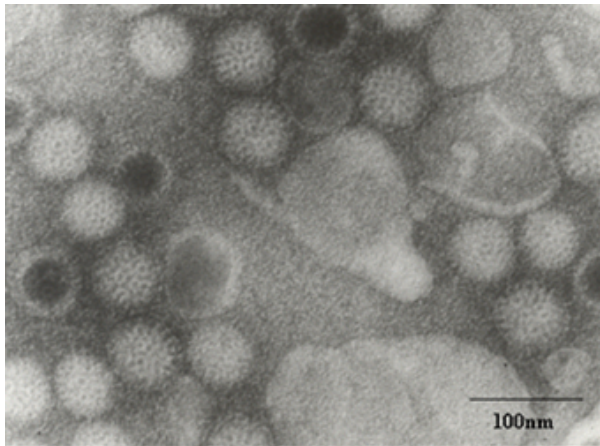


Figure 1. Electron microscopic detection of rotavirus KNIH-7 in MA104 cells.

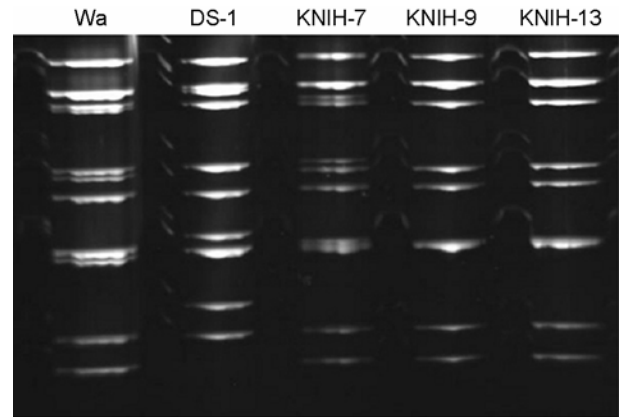


Figure 2. Electrophoretic migration patterns of genomic RNA of cell-adapted Korean G9 human rotavirus isolates. Lane 1, Wa; lane 2, DS-1; lane 3, KNIH-7; lane 4, KNIH-9; lane 5, KNIH-13.

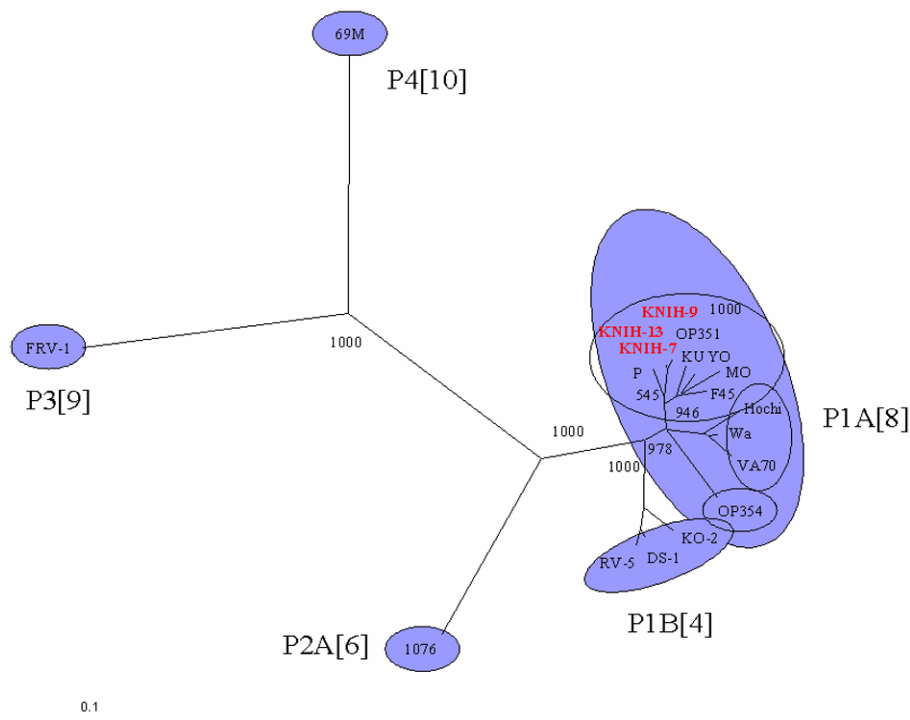


Figure 3. Phylogenetic analysis of VP4 gene of Korean G9 human rotavirus isolates in comparison with those of other representative P type rotavirus strains; DS-1 (P[4]/P1B, human, AB118025), KO-2 (P[4]/P1B, human, AF401755), RV-5 (P[4]/P1B, human, M32559), 1076 (P[6]/P2A, human, L20877), Wa (P[8]/P1A, human, L34161), VA70 (P[8]/P1A, human, AJ540229), Hachi (P[8]/P1A, human, AB039943), KU (P[8]/P1A, human, M21014), YO (P[8]/P1A, human, AB008279), MO (P[8]/P1A, human, AB008278), P (P[8]/P1A, human, AJ050228), F45 (P[8]/P1A, human, U30716), OP351 (P[8]/P1A, human, AJ302147), OP354 (P[8]/P1A, human, AJ302148), AU-1 (P[9]/P3, human, D10970), and 69M (P[10]/P4, human, M60600). The bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide.

결 과

1. 로타바이러스의 분리 및 확인

로타바이러스 genotyping을 수행하여 혈청형 G9 로타바이러스로 확인된 3개의 분변시료를 MA104 세포에 접종하여 로타바이러스 순수 분리를 시도한 결과, 모든 분변시료에서 로타바이러스를 순수 분리할 수 있었다. 분리된 바이러스는 모두 로타바이러스 특유의 CPE를 나타냈으며 plaque assay법으로 순수 분리된 3주의 바이러스를 각각 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13이라 명명하였다.

순수 분리된 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13 바이러스를 MA104 세포에서 배양한 후 negative staining하여 전자현미경으로 관찰한 결과, Fig. 1과 같이 로타바이러스의 특징적인 형태인 수레바퀴 모양의 직경 70 nm 크기의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 또한 로타바이러스 특이 단백항체를 이용하여 간접형광항체법으로 확인한 결과, 순수 분리된 바이러스가 감염된 MA104 세포에서 형광을 나타내어 로타바이러스로 확인할 수 있었다. 분

리한 바이러스의 RNA 이동 pattern을 확인하기 위하여 RNA electropherotyping을 실시한 결과, Fig. 2와 같이 로타바이러스 특유의 11개 band를 관찰할 수 있었으며 로타바이러스 표준주로 사용한 Wa 주와 유사한 이동 pattern을 보였다.

2. 로타바이러스의 분자생물학적 특성

1) VP7 유전자 염기서열 분석

순수 분리한 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13 로타바이러스의 VP7 유전자 염기서열을 분석하고 GenBank에 등록된 외국 분리주의 VP7과의 유전적 상관성을 조사한 결과, 분리한 3주와 group A에 속하는 로타바이러스의 상동성 범위는 64.2~99.9% 범위로 나타났으며, 혈청형 G9인 사람 로타바이러스와는 89.2~99.9%의 비교적 높은 상동성을 나타냈고, 혈청형 G7인 조류 로타바이러스 Ty-1과는 64.2%의 낮은 상동성을 나타내었다. 또한, KNIH-7 (DQ990317), KNIH-9 (DQ990318) 그리고 KNIH-13 (DQ990319) 간에 VP7 상동성은 98.5~100%로 나타났다. 이 결과로 분리한 3주는 모두 혈청형 G9 로타바이러스로

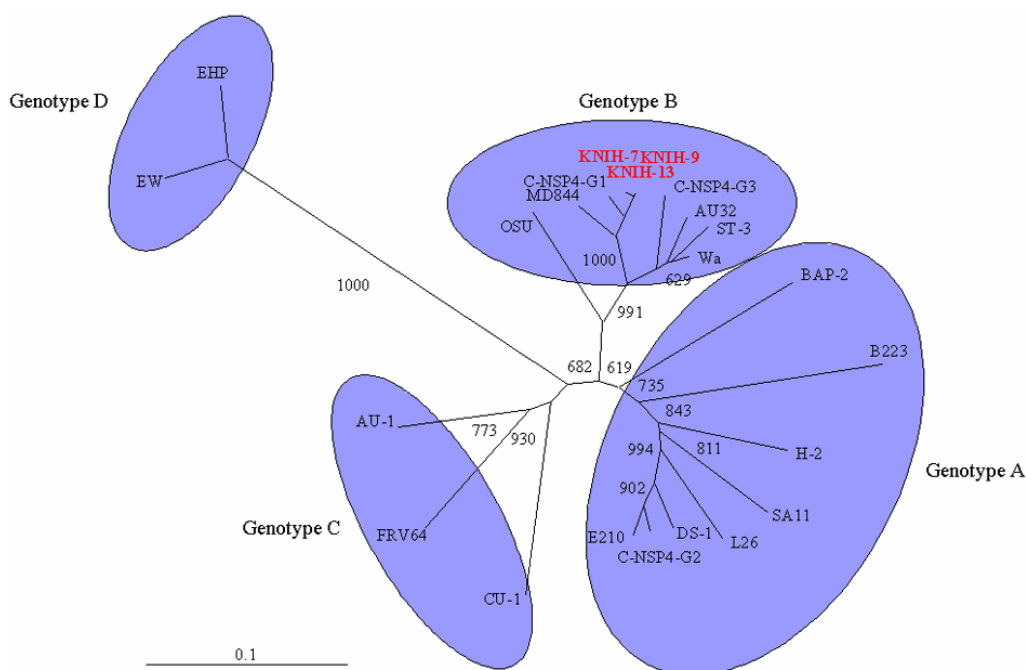


Figure 4. Phylogenetic analysis of *NSP4* gene of Korean G9 human rotavirus isolates in comparison with those of other representative *NSP4* rotavirus strains; DS-1 (A/G2, human, AF174305), SA11 (A/G3, simian, AF087678), H-2 (A/G3, equine, AF14481), BAP-2 (A/G3, lapine, AF144795), B223 (A/G10, bovine, AF144805), L26 (A/G12, human, AJ311732), E210 (A/G2, human, U59107), CBNU-2 (A/G2, human), MD844 (B/G12, human, AF269688), Wa (B/G1, human, AF093119), ST-3 (B/G4, human, U59110), OSU (B/G5, porcine, D88831), AU32 (B/G9, human, D88830), CBNU-1 (B/G1, human), CBNU-3 (B/G3, human), AU-1 (C/G3, human, D89873), CU-1 (C/G3, canine, AF144806), FRV64 (C/G3, feline, D88833), EW (D/G3, murine, AB003805), and EHP (D/G3, murine, U06336). The bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide.

확인할 수 있었다.

2) VP4 유전자 염기서열 분석

혈청형 G9으로 확인된 사람 로타바이러스 분리주 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13에 대한 VP4 유전자 염기서열을 분석하고 4개의 P 유전자형 (P[8], P[4], P[6], P[9])과의 유전적 상관성을 조사하기 위하여 VP7 유전자 분석과 같은 방법으로 조사하였다. Group A 로타바이러스의 4개의 P 유전자형과 유사성을 비교분석한 결과, 분리한 3주는 모두 유전자형 P[8]로 확인되었으며 같은 P 유전자형간의 상동성은 88.0~99.0%로 나타났고, 서로 다른 P 유전자형간의 상동성은 44.0~86.0%로 나타났다. 계통 유전학적 분석결과, P[8] cluster 내에는 3개의 더 작은

cluster를 이루고 있으며, 국내 분리주 3개 모두 Hochi, Wa, VA70, OP354 등이 속해 있는 cluster와는 다른 KU, YO, MO, P, F45 등과 같은 cluster를 이루었다 (Fig. 3).

3) NSP4 유전자 염기서열 분석

국내 분리 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13 로타바이러스 NSP4 유전자를 분석한 결과, 모두 750개의 염기서열을 가지고 있었다. 국내에서 분리된 3주의 사람 로타바이러스 NSP4 유전자, 충북대에서 보고된 로타바이러스 NSP4 유전자, 그리고 GenBank에 보고된 동물 및 사람 로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열을 다중 정렬하여 비교한 결과, 4개의 그룹으로 분류되었고 (Fig. 4), 3개의 국내 분리주의 NSP4 유전자는 모두 유전자형 B에

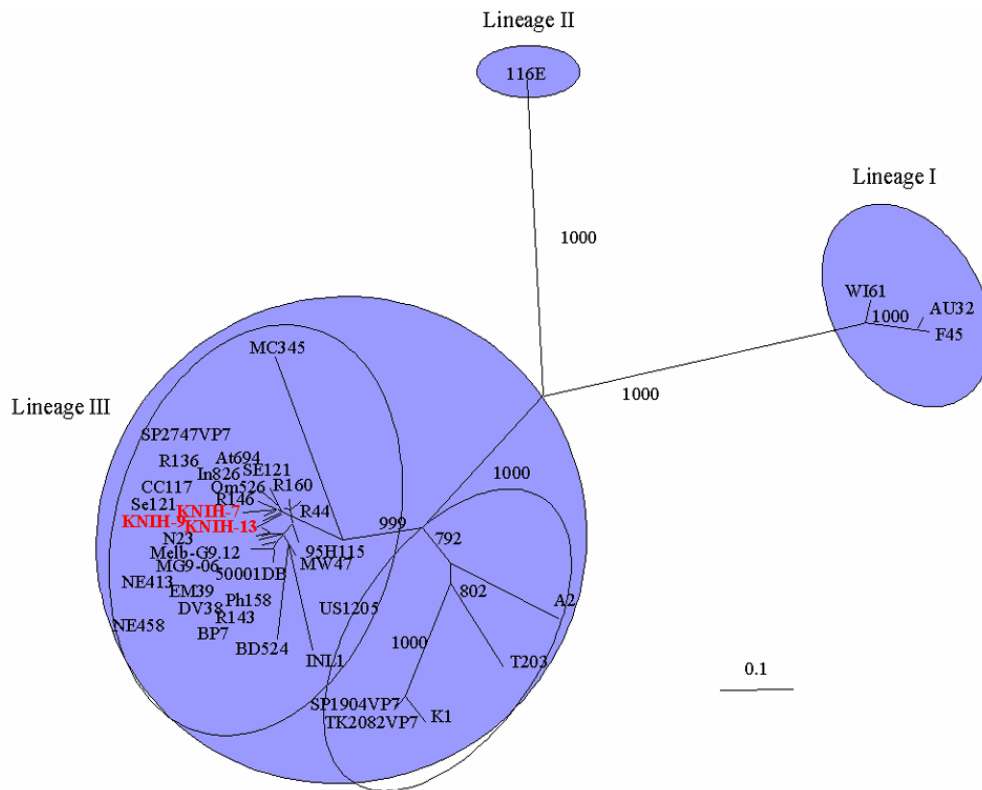


Figure 5. Phylogenetic analysis of VP7 gene of Korean G9 human rotavirus isolates in comparison with those of other representative G9 rotavirus strains; WI61 (I, human, USA, AB180969), F45 (I, human, Japan, AB180970), AU32 (I, human, Japan, AB045372), 116E (II, human, India, L14072), SP2747VP7 (III, human, Japan, AB045372), 95H115 (III, human, Japan, AB045373), K-1 (III, human, Japan, AB045374), SP1904VP7 (III, human, Japan, AB091754), A2 (III, porcine, USA, AB180971), US1205 (III, human, USA, AF060487), R143 (III, human, Brazil, AF274969), R146 (III, human, Brazil, AF274970), R160 (III, human, Brazil, AF274971), R44 (III, human, Brazil, AF438227), R136 (III, human, Brazil, AF438228), 5001DB/97 (III, human, South Africa, AF529864), INL-1 (III, human, India, AJ250227), BD524 (III, human, Bangladesh, AJ250543), MW47 (III, human, Malawi, AJ250544), CC117 (III, human USA, AJ491153), At694 (III, human USA, AJ491159), BP7 (III, human, India, AJ491161), DL73 (III, human, India, AJ491165), DL38 (III, human, India, AJ491165), EM39 (III, human, USA, AJ491169), In826 (III, human, USA, AJ491173), N23 (III, human, India, AJ491177), NE413 (III, human, USA, AJ491178), NE458 (III, human, USA, AJ491180), Om526 (III, human, USA, AJ491182), Ph158 (III, human, USA, AJ491183), SE121 (III, human, USA, AJ491192), T203 (III, human, China, AY003871), MG9-06 (III, human, Australia, AY307805), Melb-09.12 (III, human, Australia, AY307088), TK2082VP7 (III, human, Japan, AB091755), and Mc345 (III, human, Thailand, D38055). The bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide.

속하였다. 같은 유전자형 B와는 91.5~98.3%의 상동성을 보였으며, 다른 유전자형과는 60.2~85.8%의 상동성을 보였다. 국내에서 분리된 3주의 로타바이러스는 국내에서 보고된 CBNU-G1과 가장 유사하였으며 (98.3%, 97.7%), 외국 분리주와는 MD844 (Human, G12)와 가장 유사한 것으로 나타났다 (95.5%, 94.9%). 또한 KNIH-7 (EF033202), KNIH-9 (EF033203) 그리고 KNIH-13 (EF033204) 간에 NSP4 상동성은 99.8~100%로 나타났다.

4) 혈청형 G9 유전자 염기서열 분석

혈청형 G9으로 확인된 국내 분리주 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13과 외국 유래 G9 로타바이러스 간의 유전적 상관관계를 조사한 결과, 크게 3개의 cluster로 구분되는 것이 관찰되었고 KNIH-7, KNIH-9 및 KNIH-13 로타바이러스들은 모두 lineage III에 속하는 것으로 확인되었다 (Fig. 5). Lineage III 그룹과는 94.2~99.6%의 높은 상동성을 보였으며, 다른 lineage 그룹과는 88.5~89.9%의 상대적으로 낮은 상동성을 보였다. 특히 lineage III 그룹에서도 2개의 작은 cluster를 이루는 것이 확인되었으며 이 cluster 간의 상동성은 94.2~95.2%의 상동성을 보였다. 또한 돼지 G9 로타바이러스와도 95.0~95.2%의 높은 상동성을 나타냈다.

각 바이러스 간의 유사행렬을 분석한 결과, KNIH-7과 KNIH-13은 서로 동일함을 보였으며, 다른 G9 바이러스들과 비교할 때 2004년에 분리된 SP2737VP7 주와 가장 높은 99.7~99.9%의 상동성을 나타냈고, 1993년 분리된 116E 주와는 가장 낮은 88.5%의 상동성을 보였다.

고 찰

Group A 로타바이러스는 VP7 유전자에 의해 16개의 G 혈청형이 알려져 있으며 이 중 10개의 G 혈청형 (G1-G6, G8, G9, G10, G12)이 사람과 관련된 것으로 보고되어 있으며 (20) 특히 G1-G4 혈청형이 전 세계적으로 90% 이상을 차지해 왔다 (28). 따라서 로타바이러스에 대한 백신개발은 특히 이 4가지 혈청형을 대상으로 연구되어지고 있다. 하지만, 최근 G9 혈청형의 다양성이 보고되고 있는 가운데 G9 혈청형 로타바이러스가 1983년 미국 필라델피아 지역에서 처음 보고가 된 후 10년간 발견되지 않다가 전 세계적으로 급격하게 증가하고 있는 추세이다. 오세아니아 지역과 남아메리카의 경우 일반적인 타입인 G3, G4 혈청형보다 더 높은 비율로 발생하고 있

으며 (29), 일본에서도 1988년 처음 보고된 이후, 점차 증가하고 있어 G9 혈청형도 G1-G4 혈청형과 함께 중요한 혈청형으로 대두되고 있으며 홍콩, 벨기에, 이탈리아, 가나 등 세계 각국에서 G9 혈청형의 전체 유행율의 5.1~74.7%를 차지하는 중요한 혈청형으로 보고되고 있다 (4, 24,33).

본 연구에서는 2003년 로타바이러스 혈청형 G9으로 확인된 분변 샘플을 이용하여 조직배양을 통해 바이러스를 순수 분리하고 분리한 바이러스의 주요 유전자인 VP4, VP7 및 NSP4의 염기서열을 분석하였으며, 또한 사람을 포함한 여러 동물 유래 로타바이러스 간의 유전적 상관 관계를 조사하였다.

사람 로타바이러스 분리 및 배양에 MA104 세포가 일반적으로 많이 사용되고 있으며 Sato 등 (30)은 사람 로타바이러스를 MA104 세포를 사용하여 바이러스를 trypsin으로 처리하고 배지 중에 trypsin을 첨가함으로써 분변 샘플에서 바이러스를 직접 분리할 수 있었다. 본 연구에서도 Sato 등의 방법으로 바이러스 분리를 시도한 결과, 분변으로부터 바이러스를 직접 순수 분리하여 단층 배양된 조직배양 상에서 과립형태로 나타나는 로타바이러스 특유의 세포변성효과를 관찰할 수 있었고 전자현미경으로 조직배양액을 검사하였을 때 로타바이러스 입자를 확인할 수 있었다. 현재까지 국내에서 G9 혈청형 로타바이러스의 감염여부를 RT-PCR 및 nested multiplex PCR법으로 확인하여 보고된 적은 있으나 (1,2,17) 조직배양법을 이용하여 순수 분리한 것은 처음으로, 본 연구에서 분리된 로타바이러스는 G9 혈청형 백신개발 및 혈청학적 검사에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

로타바이러스 G9 혈청형은 일반적으로 P[8] 또는 P[6] 유전자형과 조합이 되는데 이 조합형은 전 세계적으로 로타바이러스 감염의 4.1%를 차지하는 것으로, 이는 P[8]/G3 조합형 (3.4%)보다 더 높은 비율을 보여주고 있으며 G9 혈청형의 조합이 4번째로 널리 유행하는 주로 나타났다 (28). 본 연구에서도 국내에서 분리한 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13 로타바이러스의 VP4 유전자 염기서열을 분석하여 각 type의 유전자형과 다중 정렬한 결과, 3개 바이러스 모두 P[8] 유전자형으로 확인되었다. Jain 등 (16)은 G9 혈청형 로타바이러스는 주로 P[8]과 조합을 이루지만 이외에도 P[6], P[11], P[4], 그리고 P[19]와도 조합하여 유전자형이 다양함을 보고하였다. 반면, 국내에서 보고된 G9 혈청형 로타바이러스의 경우, 보고된 G9

혈청형 로타바이러스의 숫자가 적기는 하지만 대부분의 G9 로타바이러스가 본 연구의 결과와 마찬가지로 P[8]과 조합되는 것으로 보고하였으나 (2,17), 박 등 (1)은 2002년 가검물에서 4개의 G9 혈청형 로타바이러스 중 2개는 P[6] 그리고 2개는 P[8]과 조합되는 것으로 보고하였다. VP4 염기서열의 분석을 통하여 계통도를 관찰한 결과, 유전자형 P[8]이 3개의 cluster로 나뉘어짐을 확인하였으며, 분리주와 같은 cluster에 속한 OP351, YO, MO strain 등과의 상동성은 91.8~99.3%였으며, 그 외 cluster와는 88.5~90.4%로 상대적으로 낮은 상동성을 보였다.

최근 사람 및 동물에서 분리된 로타바이러스의 NSP4 유전자 염기서열을 분석한 결과, 로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열 상동성에 따라 A, B, C 그리고 D의 서로 다른 NSP4 유전자그룹이 존재한다고 보고되었다 (22). 본 연구에서 분리한 3개의 G9 혈청형 사람 로타바이러스 KNIH-7, KNIH-9 그리고 KNIH-13주의 NSP4 유전자 계통수를 분석한 결과, 모두 유전자그룹 [B]로 확인되었으며, 이는 조 등 (2)이 국내에서 발생된 로타바이러스 중 G9 혈청형에 속하는 CAU22의 NSP4 유전자가 NSP4 [B]에 속한다고 보고한 것과 일치하였다. 같은 유전자그룹 [B] 내의 로타바이러스 NSP4 유전자의 염기서열 상동성을 확인한 결과, 국내 분리주인 G3 혈청형인 CBNU-G3와는 97.7~98.3%로 높은 상동성을 보였으며 외국 분리주와 같은 G9 분리주인 AU32보다는 G12 혈청형 분리주인 MD844와 더 높은 상동성을 보여 NSP4 유전자그룹이 G 혈청형과는 상관성이 없는 것으로 나타났다.

G9 혈청형 로타바이러스는 현재 전 세계적으로 적어도 3개의 lineage로 나뉜다고 보고되고 있다 (29). Lineage I은 1980년대에 미국과 일본에서 분리된 주가 포함되고 있으며 lineage II의 경우, 인도에서 발견된 116E 한 주이다. 반면에 lineage III의 경우, 현재 대부분의 G9 혈청형이 여기에 속한다. 또한 다수의 minor한 lineage가 존재한다고 보고되어 있다 (23). 본 연구에서 분리한 3개의 G9 혈청형 사람 로타바이러스는 기존에 보고된 것과 같이 세계적으로 유행하는 lineage III에 속하였으며, 외국 유래 G9 혈청형 간에 유전적 상관관계를 조사한 결과, 2000년 일본에서 분리된 SP2747VP7 주와 99.7~99.9%로 가장 높은 상동성을 보여 3개의 분리주가 이와 매우 유사함을 확인할 수 있었으며 같은 일본에서 분리된 1999년 분리주 (SP1904VP7)와는 94.5~94.6%로 상대적으로 낮은 상동성을 보였다. 하지만, 1998년 인도에서 분리된

DL73 주와는 99.6~99.8%의 상동성을 보여, 시간보다는 지역적 상관성이 유전적으로 밀접함을 보여주어 국내 G9 혈청형 로타바이러스가 위 지역과 연관성이 있음을 추론할 수 있었다. 또한 돼지 유래주인 A2 주와는 95.0~95.2%의 상동성을 보였다.

본 연구에서 분리된 G9 혈청형 로타바이러스의 수가 많지 않아 국내에서 유행하는 G9 혈청형의 분자유전학적인 예로서 설명하기에는 부족함이 있다. 이전에는 G9 혈청형이 비정형적인 혈청형이었으나 점차 발병율이 높아지는 것으로 보고되고 있는 것을 고려할 때, G9 혈청형 로타바이러스를 MA104 세포를 통하여 처음으로 순수 분리하고 이들 바이러스의 중요 유전자 (VP4, VP7, NSP4)에 대한 분자생물학적인 특성 연구는 매우 의의가 있는 것으로 사료된다. 앞으로 국내 G9 혈청형의 지속적인 surveillance를 통하여 더 많은 수의 G9 혈청형을 확보하여 이에 대한 분자생물학적 연구가 수행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) 박선경, 허연선, 빙혜선, 천두성, 초가기, 전무형: 대전 지역 설사환자 분변 유래 group A rotavirus의 P 및 G 유전자 분포. *J Bacteriol Virol* **37**: 169-175, 2007.
- 2) 조성림, 안장훈, 김기정, 정상인, 임인석, 김원용: 서울 지역에서 분리한 사람 로타바이러스 비구조단백질 NSP4의 유전적 변이. *J Bacteriol Virol* **36**: 79-87, 2006.
- 3) 지영미, 이정배, 천두성, 최우영, 김운호, 이정수, 이강범, 이희규, 윤재득: 국내 유행 바이러스성 장염의 역학. *소아감염* **11**: 17-19, 2004.
- 4) Bon F, Fromantin C, Aho S, Pothier P, Kohli EG: P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P strain at low frequencies. *J Clin Microbiol* **38**: 1681-1683, 2000.
- 5) Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK: Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* **145**: 371-383, 2000.
- 6) Cohen J, Charpilienne A, Chilmoneczyk S, Estes MK: Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* **171**: 131-140, 1989.
- 7) Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function.

- Microbiol Rev* **53**: 410-449, 1989.
- 8) **Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF**: Rotaviruses: A review. *Curr Top Microbiol Immunol* **105**: 123-184, 1983.
 - 9) **Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK**: Identification of group A rotavirus gene 4 type by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 1365-1373, 1992.
 - 10) **Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY**: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* **28**: 276-282, 1990.
 - 11) **Graham DY, Estes MK**: Proposed working serologic classification system for rotaviruses. *Ann Inst Pasteur* **136**: 5-12, 1985.
 - 12) **Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD**: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* **16**: 473-477, 1982.
 - 13) **Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RT**: Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Pro Natl Acad Sci* **82**: 8701-8704, 1985.
 - 14) **Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ**: Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis* **149**: 694-702, 1984.
 - 15) **Iturriza-Gomara M, Gagandeep K, Gray J**: Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* **31**: 259-265, 2004.
 - 16) **Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR**: Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol* **39**: 3524-3529, 2001.
 - 17) **Kang JO, Kilgore P, Kim JS, Nyambat B, Kim JG, Suh HS, Yoon YM, Jang SJ, Chang CH, Choi SW, Kim MN, Gentsch J, Bresee J, Glass R**: Molecular epidemiological profile of rotavirus in South Korea, July 2002 through June 2003: Emergence of G4P[6] and G9P[8] strains. *J Infect Dis* **192**(Suppl 12): S57-S63, 2005.
 - 18) **Kang SY, Benfield DA, Gorziglia M, Saif LJ**: Characterization of the neutralizing epitopes of the VP7 of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol* **31**: 2291-2297, 1993.
 - 19) **Kang SY, Nagaraja KV, Newman JA**: Primary isolation and identification of avian rotaviruses from turkeys exhibiting signs of clinical enteritis in a continuous MA104 cell line. *Avian Dis* **30**: 494-499, 1986.
 - 20) **Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM**: Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology*. 4th ed. pp.1787-1833, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
 - 21) **Kattoura MD, Clapp LL, Patton JT**: The rotavirus non-structural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology* **191**: 698-708, 1992.
 - 22) **Kirkwood CD, Palombo EA**: Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology* **236**: 258-265, 1997.
 - 23) **Laird AR, Gentsch JR, Nakagomi T, Nakagomi O, Glass RI**: Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol* **41**: 3100-3111, 2003.
 - 24) **Lo JY, Szeto KC, Tsang DN, Leung KH, Lim WW**: Changing epidemiology of rotavirus G-type circulating in Hong Kong. *J Med Virol* **75**: 170-173, 2004.
 - 25) **Mattion NM, Cohen J, Aponte C, Estes MK**: Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* **190**: 68-83, 1992.
 - 26) **Meyer JC, Bergmann CC, Bellamy AR**: Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* **171**: 98-107, 1989.
 - 27) **Poncet D, Aponte C, Cohen J**: Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* **67**: 3159-3165, 1993.
 - 28) **Santos N, Hoshino Y**: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine *Rev Med Virol* **15**: 29-56, 2005.
 - 29) **Santos N, Volotao EM, Soares CC**: VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res* **93**: 127-138, 2003.
 - 30) **Sato K, Inaba Y, Shinozaki T, Fujii R, Matumoto M**: Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* **69**: 155-160, 1981.
 - 31) **Tafazoli F, Zeng CQY, Estes MK**: The NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol* **75**: 1540-1546, 2001.
 - 32) **Yolken R, Arango-Jaramillo S, Eiden J, Vonderfecht S**:

Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *J Infect Dis* **158**: 1120-1123, 1988.

33) **Yoshinaga M, Phan TG, Nquven TA, Yan H, Okitsu S,**

Muller WE, Ushijima H: Changing distribution of group A rotavirus G-type and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol* **151**: 183-192, 2006.
