

Infectious bursal disease 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region 분석

박유진* · 김수정 · 권혁무

강원대학교 수의학과

*강원도립춘천수렵장

(2001년 6월 27일 게재승인)

Sequence analysis of the hypervariable region in VP2 gene of infectious bursal disease vaccine strains

Yoo-jin Park*, Soo-joung Kim, Hyuk-moo Kwon

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

*Kangwon provincial chunchon hunting grounds

(Accepted by June 27, 2001)

Abstract : To detect the genetic variations among infectious bursal disease (IBD) vaccine strains, the hypervariable region of VP2 gene of seven IBDV vaccine strains were amplified using reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT/PCR). Amplified PCR products of IBDV were cloned, sequenced, and compared with published sequences for IBDV. Vaccine strains (JOONG, HAN, B7, IB, BU2, G2, CIL) used in Korea and Korean field isolates (SH/92, K1, 310) had 81% (310 and HAN) ~ 98% (SH/92 and CIL) amino acid sequence similarity. Vaccine strains had 80% (HAN and IB) ~ 99% (JOONG and BU2) amino acid sequence similarity. Intermediate plus vaccine strain, CIL was not substituted at positions 279 (D → N) and 284 (A → T), and conserved in serine-rich heptapeptide. At the two hydrophilic region, JOONG, IB and BU2 strains had identical amino acid sequence comparing with STC strain. By phylogenetic analysis, JOONG and DAE strains were categorized in same group with BU2. The CIL and STC strains closely related but separated from G2, HAN, B7 and IB strains.

Key words : Infectious bursal disease virus (IBDV), hypervariable region, VP2 gene, RT/PCR, sequence

서 론

전염성 F 낭병 (infectious bursal disease, IBD)은 3~6주령 된 어린 닭의 F 낭 (bursa of Fabricius)에 주로 손상을 일으켜 면역 억제와 사료 효율 저하, 증체량 감소, 폐사를 증가로 세계적으로 양계산업에 심각한 손실을 초래하는 전염성이 높은 질병으로, 전염성 F 낭병 바이러스 (infectious bursal disease virus, IBDV)가 원인체이다¹.

IBDV는 Birnaviridae에 속하는 Avibirnavirus이며 segment A와 B의 두 개의 분절로 이루어진, double-stranded RNA 바이러스이다². Segment A (3.4 kilobase pairs, kb)는 하나의 긴 3039 base pair (bp)의 open reading

frame (ORF)과 긴 ORF의 5' 말단을 overlapping 하는 438 bp의 작은 ORF를 가진다³. 긴 ORF는 VP2 (37~40 kiloDalton [kD]), VP4 (24 kD), VP3 (32~35 kD)로 나누어지는 110 kD의 precursor polyprotein (NH₂-VP2-VP4-VP3-COOH)을 발현한다^{4,7}. VP2와 VP3는 IBD 바이러스의 주요 구조 단백질로 이 중 VP2는 IBDV의 주요 숙주 방어 항원으로 중화항체를 유도하는 항원결정기 (epitope)를 포함하고 있고^{5,8}, VP4는 단백질을 분해하는 효소와 같은 단백질이다⁶. 짧은 ORF는 VP5 (17 kD)를 발현하는데, IBDV에 감염된 세포에서만 나타나는 비구조적 단백질로 세포배양에서 바이러스 복제에 필수적인 것은 아니지만, 병원성을 일으키는데 중요한 역할을 한다

고 알려지고 있다⁹. Segment B(2.7 kb)는 viral RNA polymerase로 되는 VP1(90 kD)을 발현한다^{4,5,7}.

IBDV는 두 개의 serotype(serotype 1과 2)으로 구분되는데⁸, 칠면조에서 분리된 serotype 2는 칠면조, 닭 모두에 병원성이 없는 반면, 닭에 병원성이 있는 serotype 1은 항원성의 변이와 병원성에 따라 classical virulent strain(표준주), attenuated strain(약병원성주), antigenic variant strain(변이주)과 very virulent(vv) strain(강병원성주)으로 구분된다¹⁰. 표준주는 감염된 닭에서 F 낭의 염증을 일으키고, 심한 림프구성 괴사로 면역억제와 폐사를 일으킨다. 일반적으로 폐사율은 감염된 지 3일 이내에 최고에 이르지만, 8~10일까지도 폐사가 계속되어 전체 계군의 20~30% 까지 폐사율이 높아진다¹⁰. 약병원성주는 계태아 섬유아세포나 다른 cell line에 배양한 바이러스로 병원성이 없어 일부는 생바이러스 백신으로 이용된다¹¹. 강병원성주는 항원적으로 표준주와 유사하지만 IBD의 전형적인 병변을 일으키며, 높은 수준의 모체 이행항체를 가진 개체에서도 폐사율이 60~100% 까지 발생될 수 있다^{12,13}. 강병원성주의 경우 높은 수준의 모체 이행항체를 받은 병아리에서도 폐사가 발생하므로 attenuated 백신보다 병원성이 강한 intermediate 및 intermediate plus 백신이 나오게 되었다. 변이주는 표준주에 대한 항혈청에 교차중화되지 않아 표준주로 제조된 기존 백신으로 예방이 어려우며, 폐사는 거의 발생되지 않으나 F 낭이 염증 없이 심한 위축으로 면역억제를 나타낸다^{14,15}. IBDV에 의한 닭에서의 면역억제는 다른 감염에 대한 감수성을 높게 하고 다른 질병의 백신 효과를 떨어뜨린다¹⁶.

IBDV는 두 개의 serotype과 몇 개의 antigenic subtype이 있어 백신 사용으로 IBD를 방어하는 것은 쉽지 않다¹⁵. Serotype 1의 특정 antigenic subtype으로 백신한 후, 공격 바이러스가 serotype 1의 다른 antigenic subtype일 때 IBD를 항상 방어할 수 있는 것은 아니다¹⁷. 그러므로 현재 닭이 사육되고 있는 환경에 존재하는 IBDV의 antigenic subtype에 맞는 적절한 백신의 선택이 이루어

어져야 IBD의 효과적인 예방이 가능하다. 1987년 벨기에에서 강병원성주가 나타난 이래 만족스러운 백신 프로그램을 만드는데 많은 어려움이 있어 왔다. 야외에서 계속적으로 발견되는 바이러스를 효율적으로 방어하기 어려운 것은 병원성의 증가와 표준주에 의한 항체로는 바이러스 중화능을 감소시키는 바이러스의 변이가 그 원인이며, 현재 사용하고 있는 백신이 효과가 없거나, 백신 사용으로 모체이행항체의 간섭이 일어나기 때문이다¹².

IBDV의 antigenic subtype은 세포배양이나 계태아란에서의 중화시험, 또는 백신의 공격접종 연구로 결정할 수 있다^{15,17}. 최근에는 IBDV 감염을 진단하는데 reverse transcriptase/polymerase chain reaction(RT/PCR)을 이용하고, RT/PCR product의 제한 효소 분석으로 각 strain 간의 병원성을 구분할 수 있다¹⁸. IBDV의 주요 구조 단백질인 VP2는 hypervariable region에서만 주로 mutation이 일어나, 이 부위는 IBD를 예방하기 위한 IBDV의 항원성과 병원성의 특성을 규명하는데 이용되어 왔다^{4,8,18-20}.

본 연구는 국내에서 사용중인 IBD 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region을 RT/PCR로 증폭하여 cloning한 후 염기서열을 분석하고, 국내의 분리주 및 백신주와의 비교·분석을 통한 각 strain 간의 항원성 및 병원성의 변이를 파악하여 IBD를 효율적으로 예방하기 위한 백신 선택의 지침을 마련하고자 수행되었다.

재료 및 방법

Infectious bursal disease(IBD) vaccine strains

국내에서 사용중인 7개사 7종(국산 2종, 외국 5종)의 IBD 생바이러스 백신을 본 연구에 사용하였다(Table 1).

Viral RNA의 추출과 정제

IBDV 백신을 동량의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 부유시킨 다음, 희석액에 chloroform을 동량 섞은 후 12,000 RPM에서 2분간 원심분리하였다. RNA

Table 1. Infectious bursal disease vaccine strains used in this study

| Designation | Virulence | Trade name | Origin |
|-------------|-----------|-------------|--|
| JOONG | A* | | 중앙가축전염병연구소 |
| HAN | A | | 한국미생물연구소 |
| B7 | A | Bur-706 | Merial, France |
| IB | A | IBD BLEN | Merial Select Inc., U.S.A. |
| BU2 | I | Bursine-2 | Fort Dodge Animal Health, U.S.A. |
| G2 | I | GUMBORO 2 | IZO S.p.A., Italy |
| CIL | I Plus | CEVAC IBD L | Phylaxia-Sanofi Vet. Biologicals Co. Ltd., Hungary |

* : A = attenuated, I = intermediate.

의 추출과 정제는 Kwon *et al*²¹의 방법에 따라 실시하였다. 상층액을 새 원심튜브에 옮긴 후 2% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 proteinase K(250 µg/ml)를 첨가하여 진탕한 후, 55°C 항온수조에서 5분간 처리한 다음 acid phenol(pH 4.0)과 chloroform : isoamyl alcohol(49:1)을 첨가하여 진탕한 후 얼음에서 15분간 정치하였다. 그 다음 12,000 RPM에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 새 원심튜브에 넣고 chloroform : isoamyl alcohol(49:1)을 첨가하고 vortex하여 12,000 RPM에서 2분간 원심분리하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid[®] kit(Bio101 Inc., USA)를 이용하여 정제하였으며, diethyl-pyrocyanate(DEPC)로 처리한 멸균 증류수에 RNA를 부유한 후 cDNA 합성에 이용하였다.

Oligonucleotide primers

IBDV의 VP2 gene의 hypervariable region을 증폭하기 위하여 사용한 primer는 Lin *et al*¹⁸이 사용한 것과 동일한 것으로 P2.3(5'-CCCAGAGTCTACACCATA-3')과 RP5.3(5'-TCCTGTTGCCACTCTTTC-3')을 국내에서 합성하여 사용하였으며 이들의 부차 부위는 각각 738-755, 1194-1211 이다¹⁹. 이 primer는 VP2 gene에 있는 hypervariable region의 474 bp를 증폭할 수 있게 설계되어 cDNA 합성과 PCR에 이용하였다.

Reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RT/PCR)

cDNA 합성을 위해 준비된 RNA에 3배 용량의 100% ethanol을 넣고 -70°C에서 하루 밤 침전시킨 후 12,000 RPM에서 20분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후, 진공건조기(MAXI dry plus, Heto, Denmark)로 건조한 다음 90% dimethyl sulphoxide (DMSO)를 더하여 침전물을 용해시킨 후 DNA thermal cycler (Perkins Elmer Cetus, U.S.A.)를 이용하여 98°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에 최소 2분 동안 정치하였다. 처리한 RNA에 5 µl의 10×PCR buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 1% Triton X-100), 1 µl의 10 mM dNTP(Boehringer Mannheim, U.S.A.), 9 µl의 25 mM MgCl₂(Promega, U.S.A.), 0.5 µl의 0.1M DTT(GIBCO/BRL, U.S.A.), 250 ng의 RP5.3 primer, 40 unit의 RNasin(Promega), 200 unit의 Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO/BRL)를 혼합한 후 50 µl가 되게 DEPC로 처리한 멸균 증류수를 더한 후 DNA thermal cycler를 이용하여 37°C에서 90분, 95°C에서 5분간 반응시킨 다음 -20°C에 보관하며 PCR에 사용하였다. PCR을 위해 준비한 cDNA에 10 µl의 10×PCR buffer (Promega), 1 µl의 10 mM dNTP, 12 µl의 25 mM MgCl₂, 250 ng의 P2.3과 RP5.3

primer와 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase (Promega)를 더한 후 100 µl가 되게 멸균증류수를 첨가하였다. PCR 하기 전 반응으로 94°C에서 5분, 52°C에서 1분, 72°C에서 2분간 반응시켰으며, PCR 본 반응으로 94°C에서 1분간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 1 cycle로 총 35회 실시하였고 마지막으로 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide(10 mg/ml, Sigma, U.S.A.)가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동한 후 UV-transilluminator(Vilberourmat, France)에서 474 bp의 PCR product를 확인하였다.

Cloning 및 염기서열의 분석

국내에서 사용중인 IBDV 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region의 염기서열을 분석하기 위하여 각각의 백신주에서 추출한 viral RNA를 P2.3과 RP5.3 primer pair로 증폭시켰다. 증폭된 PCR product는 GeneClean[®] II kit(Bio 101, Inc.)을 이용하여 정제하였다. 정제한 cDNA를 pCR[®] 2.1-TOPO[®] kit(Invitrogen Corp., U.S.A.)를 사용하여 클로닝하였다. Recombinant plasmid로 competent cell을 transformation 시킨 후 kanamycin과 X-gal이 첨가된 LB agar에서 무색투명한 집락을 선택하여 LB broth에 배양한 다음 mini-prep 방법으로 plasmid DNA를 분리하여 cDNA의 삽입여부를 확인하였다. Mini-prep에서 cDNA의 삽입이 확인된 clone을 선택 후 염기서열을 결정하기 위한 다량의 plasmid DNA를 얻기 위하여 maxi-prep을 실시하였다.

DNA 염기서열은 automatic DNA sequencer (long read IR 4200, Li-cor, U.S.A.)로 분석하였다. 분석된 백신주의 염기서열을 국내의 IBDV 분리주 및 백신주와 DNASIS version 7.0 software (Hitachi software engineering Co., Japan)를 이용하여 분석하였고, 다양한 IBDV strain 간 구조 단백질의 유전적인 연관성을 알아보기 위하여 phylogenetic tree를 작성하였다. 본 연구에서는 이미 염기서열이 밝혀진 국산 백신주인 대성²², 영국의 비병원성 백신주인 PBG98¹⁹, 미국의 표준 intermediate 백신주인 BV3, 변이주인 DELE²⁴, 국내분리주인 SH/92, K1, 310²²과 미국의 표준형 병원성주인 STC^{25,26}를 염기와 아미노산의 서열 비교 분석에 사용하였다.

결 과

IBDV 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region을 P2.3, RP5.3 primer pair로 증폭하였을 때 모든 백신주에서 474 bp의 동일한 밴드가 확인되었으며, 결정된 염기와 아미노산 서열을 국내의 분리주 및 백신주들과 비

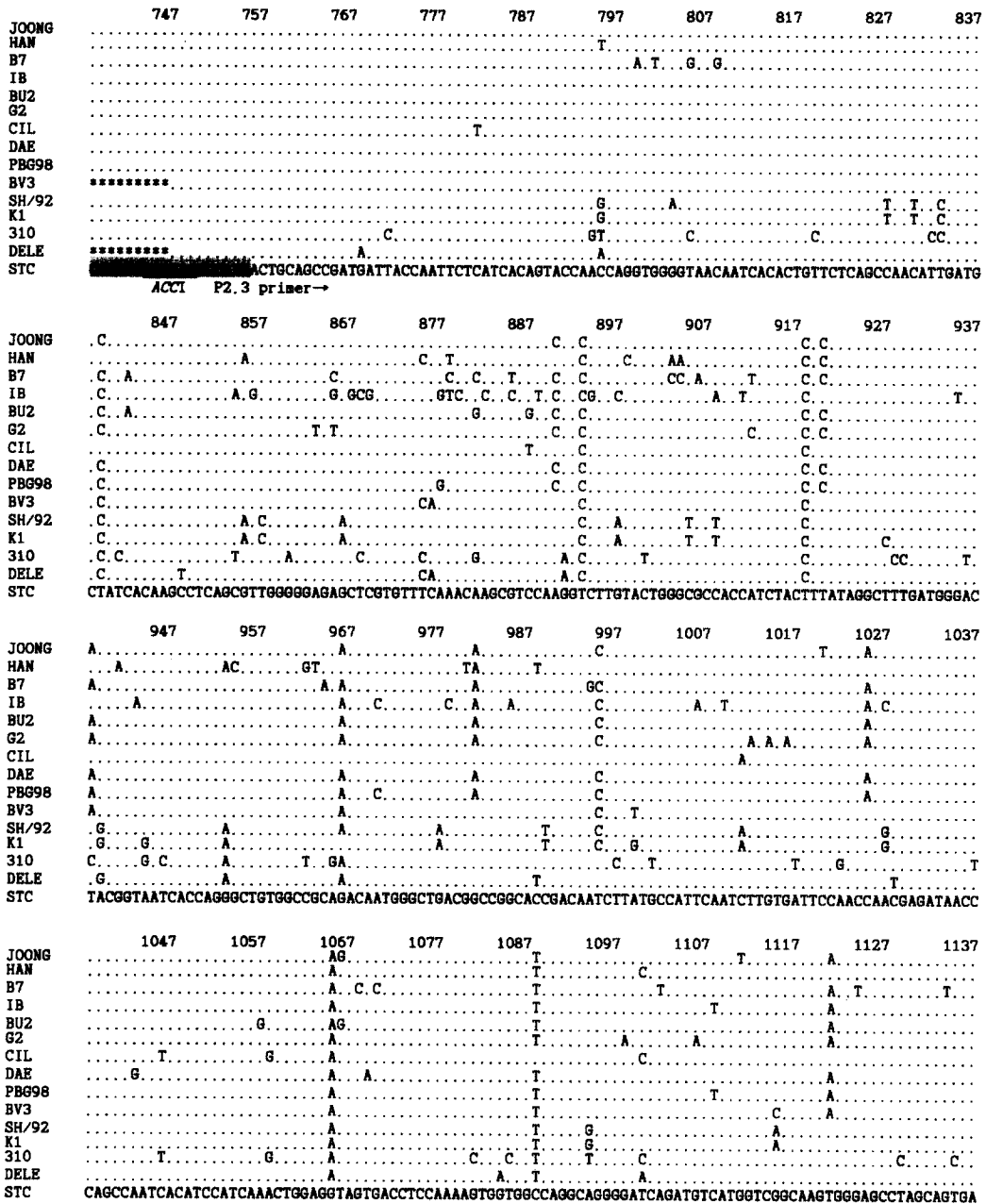


Fig 1. Nucleotide sequences of VP2 region of IBDV from positions 738 to 1211 (numbering of Bayliss *et al*¹⁹) of the vaccine strains, JOONG, HAN, B7(Bur-706), IB(IBD BLEN), BU2(Bursine-2), G2(GUMBORO 2) and CIL(CEVAC IBD L), used in Korea, attenuated strains PBG98¹⁹, standard intermediate vaccine BV3²⁴, and Korean field isolates SH/92, K1, 310²², U.S.A. antigenic variant DELE²⁴ compared with classical virulent strain STC²⁵ sequence. A dot indicates where the sequence is identical to that of the STC strain. Asterisks(*) denote a region where the sequences were not determined. The two primers are shaded. The *Acc* I and *Spe* I restriction sites flanking the variable domain are underlined.

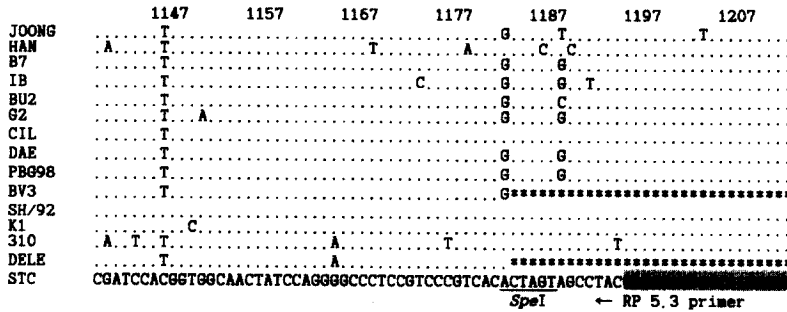


Fig 1. Continued

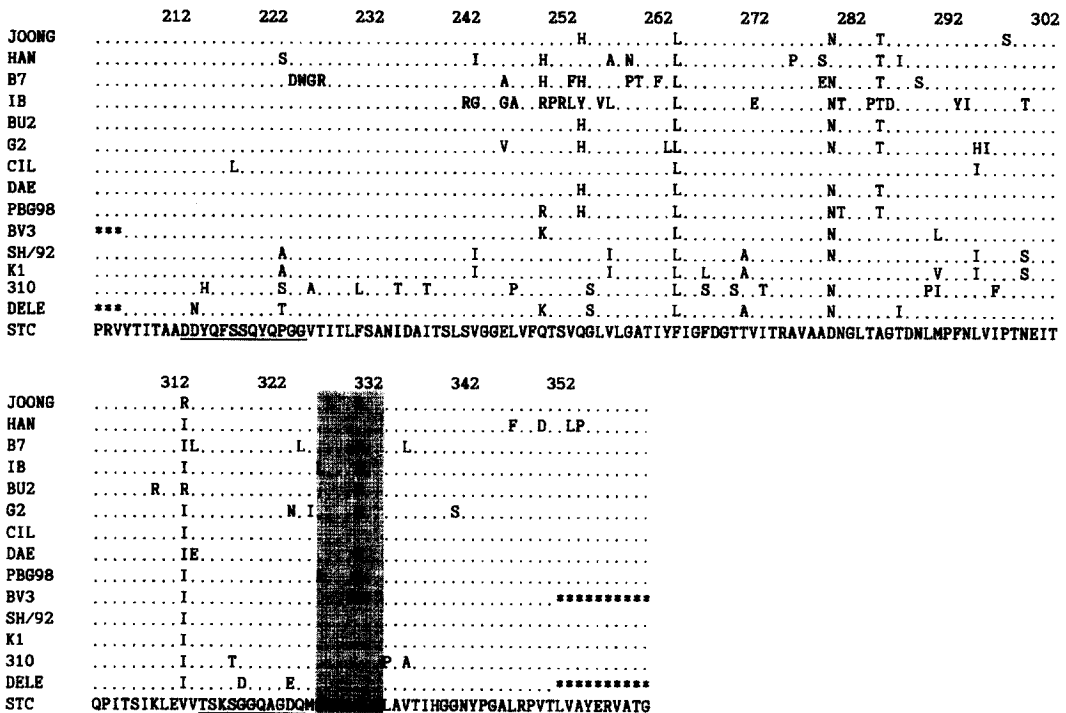


Fig 2. Deduced amino acid sequences of VP2 region of IBDV from positions 203 to 360 which correspond to VP2 major immunogenic domain (numbering according to Bayliss *et al*¹⁶). Presented IBDV strains are as shown at Fig 1. A dot indicates where the sequence is identical to that of the STC strain. Asterisks(*) denote a region where the sequences were not determined. The two hydrophilic regions(212-224, 314-324) are underlined and the serine-rich heptapeptide(326-332) is shaded.

교 · 분석하였다(Fig 1, 2).

염기서열 비교 분석에서 국산 백신주인 JOONG strain은 외국 백신주 중 IB strain과 34개의 큰 염기 차이를 나타냈으며, BU2 strain과는 단지 9개의 염기의 변화를 나타내었고, 다른 국산 백신주인 HAN strain과는 33개 부위에서 차이를 나타내었다. HAN strain의 경우 외국 백신주 중 IB strain과 54개의 큰 차이를 나타냈으며, CIL strain과는 27개의 적은 염기의 변화를 나타내었다.

바이러스 중화항체를 유도하는 항원 결정기의 일부분인 두 hydrophilic region의 아미노산 위치에 해당하는 염기서열 비교에서 B7 strain은 799(A), 781(T), 1102(T)을, CIL strain은 781(T), 1100(C)을, HAN strain은 795(T)을, G2 strain은 1098(A)을 나타내어 다른 백신들과 구별되었고, CIL strain만 1088(C)의 차이를 보여 미국 표준형 병원성 strain인 STC를 제외한 모든 strain과 차이를 나타내었다. 병원성이 있는 strain에서만 보존된다고

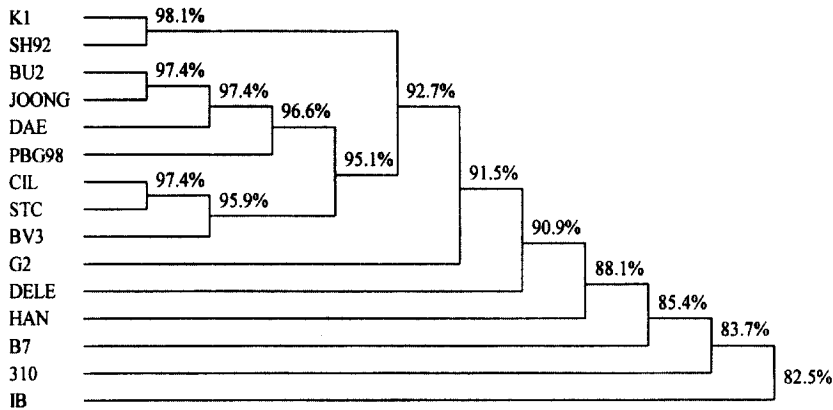


Fig 3. The phylogenetic tree was produced by the DNASIS software based on amino acid sequences 203-360 (numbering by Bayliss *et al*¹⁶) of the VP2 hypervariable region of IBDV strains. Presented IBDV strains are as shown at Fig 1.

알려진 serine-rich heptapeptide SWSASGS의 아미노산 위치의 염기서열 비교에서 IB strain은 PBG98 strain과 마찬가지로 1108(T)의, JOONG strain은 1111(T)의, B7은 1124(T)의 차이가 확인되었다. 두 hydrophilic region의 아미노산 서열 비교에서 STC strain을 기준으로 할 때 B7 strain은 223(D), 224(W), 324(L)을, HAN strain은 222(S)을, G2 strain은 323(N)을, CIL strain은 217(L)을 나타내어 다른 백신들과 구별되었고, JOONG, IB, BU2 strain은 STC strain과 동일하였다.

Attenuated strain에서 일반적으로 발견되는 279(D→N)와 284(A→T)의 변환은 intermediate 백신주인 BU2와 G2에서 일어난 반면, attenuated 백신인 HAN strain에서는 279(D)가 보존되어 다른 attenuated 백신주와 구별되었고, intermediate plus 백신주인 CIL에서는 두 변환 모두 일어나지 않아 다른 모든 백신주와 차이를 나타내었다.

HAN strain은 256(A), 258(N), 275(P), 278(S), 346(F), 349(D), 352(L), 353(P)에서, B7 strain은 225(G), 226(R), 245(A), 252(F), 258(P), 259(T), 261(F), 278(E), 288(S), 313(L), 335(L)에서, IB strain은 241(R), 242(G), 245(G), 246(A), 250(P), 251(R), 252(L), 253(Y), 255(V), 256(L), 271(E), 283(P), 284(D), 292(Y), 293(I), 299(T)에서, G2 strain은 245(V), 262(L), 294(H), 325(I), 340(S)에서, BU2 strain은 309(R)에서, JOONG strain은 297(S)에서 다른 모든 strain과 구별되는 차이를 나타내었다.

국내분리주(SH/92, K1, 310) 및 미국변이주(DELE)에서 보존되었던 serine-rich heptapeptide는 백신주 중에서 intermediate plus 백신주인 CIL에서 보존되었고, attenuated 백신주인 HAN에서도 보존되어 다른 attenuated 백신과

구별되었다. IB strain은 326(S→L)에서, JOONG strain은 327(W→L)에서 아미노산의 변환을 나타냈고, CIL과 HAN strain을 제외한 모든 백신주에서 330(S→R)에서의 변환을 나타내었다.

염기서열의 상동성 비교에서 국산 백신주인 JOONG strain은 외국 백신주와 92%~98%의 상동성을 나타내었고, 같은 국산 백신주인 HAN strain은 외국 백신주와 88%~94%의 상동성을, JOONG과는 93%의 상동성을 나타내었다. 국내 분리주(SH/92, K1, 310)와 백신주와는 84%~94%의 상동성을 나타내었다.

VP2 gene의 아미노산 서열을 기준으로 한 백신주간의 상동성 비교에서 국산 백신주인 JOONG은 IB strain과 15개, BU2 strain과는 1개의 아미노산이 달라 90%와 99%의 상동성의 차이를 나타내었다. HAN strain은 IB strain과 31개, CIL strain과 15개의 차이가 나타나 각각 80%와 90%의, JOONG strain과는 88%의 상동성을 나타내었다. 국내 분리주와 백신주와의 비교에서 310 strain과 HAN strain, SH/92와 CIL strain은 각각 29, 2개의 아미노산이 달라 81%, 98%의 상동성으로 큰 차이를 나타내었다. 국내에서 사용중인 외국 백신주들의 비교에서는 IB와 B7 strain, BU2와 CIL strain에서 각각 20개, 8개의 아미노산 서열이 달라 각각 87%, 97%의 상동성을 나타내었다.

Phylogenetic tree 분석에서, 아미노산 서열을 바탕으로 한 분석에서 JOONG strain은 BU2 strain과 한 계통으로 분류되었는데, 이들과 DAE strain은 거의 같은 계통으로 분류되었다. CIL strain은 STC strain과 한 계통으로 분류되었으며, 다른 백신주인 G2, HAN, B7, IB는 각각 별도의 계통으로 분류되었다.

고 찰

본 연구에서는 현재 국내에서 사용중인 IBD 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region을 RT/PCR로 증폭하여, cloning 한 후, 염기와 아미노산 서열을 결정하여 국내외 분리주 및 백신주와 비교·분석하였다. IBDV의 VP2와 VP3는 외부와 내부의 구조 단백질을 구성하는데 이 중 VP2의 hypervariable region에서 주로 mutation이 일어나고, 이 부위를 제외한 나머지 부분에서는 제한적으로 mutation이 일어나므로 이 부위는 IBDV의 분자생물학적 특성을 규명하는데 이용되어 왔다^{18,19}. 또한 VP2 gene은 주요 숙주 방어항원을 암호화하는 것으로 알려져 있어 IBDV genome 중에서 널리 연구되고 있다^{4,8,20}.

염기서열 비교분석에서 국산 백신주인 JOONG strain은 외국 백신주 중 IB strain과 34개로 큰 염기의 차이를 나타냈으며, 영국의 비병원성 백신주인 PBG98 strain과는 단지 8개의 염기의 변화를 나타내었고, 같은 국산 백신주인 DAE와는 7개 부위에서 적은 염기의 차이를 나타내었다. HAN strain은 같은 국산 백신주인 DAE strain과는 31개 부위에서 차이를 나타내었다. IBDV 국내 분리주(SH/92, K1, 310)와 백신주와의 비교에서 SH/92와 CIL strain, 310 strain과 IB strain은 염기서열에서 각각 27, 74개의 염기서열의 차이를 나타내었다. 국내 분리주 중 310 strain은 HAN strain과 795(T), 1139(A)에서, BU2 strain과 881(G)에서, CIL strain과는 1046(T), 1058(G)에서 동일한 염기서열을 보였고, HAN strain은 IB strain과 878(T)에서, DELE strain과는 988(T)에서, B7과 BU2 strain은 842(A)에서, IB와 PBG98 strain은 970(C)에서 동일한 염기서열을 나타내어 다른 IBDV와 구별되었다. 그러므로 이들 염기는 각 백신주를 구별하는 인식 지표로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

IBDV strains 간의 항원성의 변이는 VP2의 hypervariable region에 의하여 결정된다⁵. 두 hydrophilic region은 중화항체를 유도하는 항원 결정기의 일부로서 이 부위의 변화에 의하여 IBDV의 항원성 변이가 일어나는 것으로 알려져 있다⁵. 첫 번째 hydrophilic region의 아미노산 위치의 염기서열(765-803) 비교에서 STC strain을 기준으로 할 때 JOONG, IB, BU2, G2 strain은 DAE, PBG98, BV3 strain과 같았으나 HAN, B7, CIL strain은 1-2개의 차이를 나타내었다^{19,22,24,25}. 바이러스 중화 단클론 항체와 결합하는 것과 관련된 두 번째 hydrophilic region의 아미노산 위치의 염기서열(1071-1103) 비교에서 JOONG, IB, BU2 strain은 DAE, PBG98, BV3 strain과 동일하였으나, 나머지 백신주들은 각각 서로 다른 차이를 나타내었다^{20,22,24,25}. 이러한 결과는 염기서열의 차이가 아미노산 서열의 변화를 가져와 중화항체를 유도하는 항원 결

정기를 형성하는데 있어 어떤 변화를 줄 것으로 예상된다.

염기서열의 상동성 비교에서 국산 백신주인 JOONG strain은 같은 국산 백신주인 DAE와는 98%의 큰 상동성을 나타내었고, HAN strain은 DAE strain과 93%의 상동성을 나타내었으며, 국내에서 사용중인 외국 백신주(B7, IB, BU2, G2, CIL)와 외국 백신주(PBG98, BV3)와는 90%~97%의 상동성을 나타내었다^{20,24}.

항원성 결정에 있어 염기서열보다 더 큰 의미가 있는 아미노산 서열을 기준으로 한 백신주간의 상동성 비교에서 국산 백신주인 JOONG은 DAE strain과 3개만이 달라 98%의 높은 상동성을 나타내었다. 또한 HAN strain은 DAE strain과 89%의 상동성을 나타내었다. IBDV 국내 분리주(SH/92, K1, 310)와 백신주와의 비교에서 310 strain과 HAN strain은 81%의 상동성을, SH/92와 CIL strain은 98%의 큰 상동성을 나타내어, intermediate 백신은 attenuated 백신보다 병원성수에 항원적으로 좀 더 관련성이 있다는 Van den Berg *et al*¹²의 보고와 일치하였다. 외국 백신주들과의 비교에서는 IB와 BV3 strain, BU2와 PBG98 strain에서 각각 12개, 4개의 아미노산 서열이 달라 각각 91%, 97%의 상동성을 나타내었다.

IBDV strain은 부화란 또는 계태아 섬유아세포에서 계대되는 동안 병원성이 감소된다¹¹. 일본의 highly virulent wild-type virus인 OKYM, TKSM을 계태아 섬유아세포에서 계대 배양하여 얻은 attenuated strain인 OKYMT, TKSMT의 염기서열에서의 966(G→A), 981(G→A)의 변화 결과, 아미노산 서열에서 각각 279(D→N), 284(A→T)로 변환되었다. 이는 attenuated strain에서 일반적으로 발견되는데, 이 두 아미노산의 변환은 IBDV의 병원성에 관련된다는 것을 의미한다²⁷. 아미노산 서열 비교에서 국내에서 사용하고 있는 백신주 중 intermediate 백신주인 BU2와 G2는 이 변환이 이루어진 반면, 같은 미국의 표준 intermediate 백신주인 BV3는 284(A)가 그대로 보존되었다. HAN strain에서는 279(D)가 보존되어 다른 attenuated 백신주와 구별되었으며, intermediate plus 백신주인 CIL에서만 이 변환이 이루어지지 않아 intermediate plus 백신의 경우 병원성이 어느 정도 남아 있을 것으로 추정된다.

VP2의 아미노산 서열의 차이는 IBDV strain 간의 항원성의 차이와 관련되어 있다^{19,20}. VP2의 hypervariable region의 아미노산 서열에서 병원성이 있는 strain에서만 보존된다는 serine-rich heptapeptide SWSASGS^{18,20,28}는 병원성 바이러스와 intermediate 백신에서 보존되고 유럽과 일본의 vv strain에서도 보존되어^{13,18} 이 부위가 병원성과 관련 있는 것으로 보이지만, 계란이나 세포에서 증식되어 병원성이 약화된 일부 IBDV에서도 보존되는 경

우가 있어²⁷ 병원성 관련 여부는 다른 유전자 부위와 함께 분석되어야 한다. 이 부위는 백신주 중 CIL과 HAN strain에서만 보존되었다. IB strain은 PBG98 strain과 마찬가지로 326 위치에서 S가 L로, CIL과 HAN strain을 제외한 모든 백신주는 330 위치에서 S가 R로 변화였다. 이러한 결과는 병원성이 없거나 약한 strain에서는 1~2개의 serine이 다른 아미노산으로 대체된다는 Heine *et al*²⁰의 보고와 일치하였고, serotype 2 비병원성 OH strain은 세 개의 변환이 일어난 반면, serotype 1의 병원성이 약화된 주(D78, Cu-1, 002-73)에서는 한두개의 변환이 일어났다는 Vakharia *et al*²⁸의 보고와도 일치하였다. JOONG strain은 327 위치에서 W가 L로 변해 다른 모든 백신주와 구별되었다. 이 부위는 항원성의 변이를 일으키기 때문에 혈청형의 특이성 뿐만 아니라, 중화항체를 유도하는 항원 결정기 형성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보인다²⁸.

두 hydrophilic region(212~224, 314~324) 중 첫 번째 hydrophilic region(212~224)의 아미노산 서열 비교에서 STC strain을 기준으로 할 때 JOONG, IB, BU2, G2 strain은 DAE, PBG98, BV3 strain과 같았으나, HAN, B7, CIL strain은 1~2개의 차이를 나타내었다^{19,22,24,25}. 이 부위는 중화항체를 유도하는 항원 결정기 구조의 안정성과 관련된다^{5,20}. 그러므로 백신주 중에서 HAN, B7, CIL strain은 변화가 있는 것으로 보아 이들은 이 부위에서 아미노산의 변화로 항원 결정기의 구조적인 변화가 있을 것으로 추정된다. 두 번째 hydrophilic region(314~324)의 아미노산 서열 비교에서 JOONG, HAN, IB, BU2, CIL strain은 DAE, PBG98, BV3 strain과 같았으나, B7, G2 strain은 STC strain과는 각각 1개의 차이를 나타내어 표준형 IBDV로 제조된 백신과 구별되었다^{19,22,24,25}. 이 부위는 바이러스 중화 단클론 항체와 결합하는 것과 관련되어 있으므로 이러한 차이는 표준형 백신에 의하여 유도된 중화항체에 대하여 저항성을 나타낸다고 알려져 있다²⁰. 이상의 결과를 볼 때, 이 두 부위에서의 아미노산 차이는 각 strain 간의 항원적 차이를 유도할 것으로 보인다.

한국, 일본, 벨기에, 중국 등의 vv strain에서 공통적으로 나타나는 222(A), 256(I), 294(I), 299(S)는 CIL strain에서만 294(I)가 확인되어 어느 정도 병원성의 존재 가능성을 확인하였다^{18,22,23,27}.

한편, IB와 PBG98 strain은 249(R), 280(T), 326(L)에서 다른 IBDV와는 다른 동일한 아미노산을 보여 다른 백신주들과 구별되었다. Solvay 사의 Bursine-2 strain의 아미노산 서열²⁹은 본 연구에 사용한 Busine-2(BU2, Fort Dodge 사) strain과 222(P→S), 242(V→I), 249(Q→H), 256(V→A), 258(G→D), 278(A→S), 279(N→D), 286(T

→I), 312(R→I)의 변환을 나타내었고, serine-rich heptapeptide 부위에서는 330(R→S)로 변화되어 동일한 백신주라도 차이를 보여 제조사에 따라 다른 유전자적 특성을 나타내었다. 이러한 차이점이 나타나는 이유는 seed virus의 관리나 백신 생산 방법의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 반면, 국산 백신주인 HAN strain은 Solvay 사의 Bursine-2 strain과 258(N), 346(F), 349(D), 352(L), 353(P)의 5개 부위에서만 차이를 나타내어 더 높은 상동성을 나타내었고, 222(S), 242(I), 256(A), 278(S), 286(I)에서 동일한 아미노산을 보여 다른 모든 백신주들과 구별되었다.

Lin *et al*¹⁸은 제한효소를 이용하여 vv IBDV를 다른 IBDV와 구별하였는데, *TaqI* 인지부위에서 vv IBDV의 경우 833(C)를 나타내었고 백신주는 모두 833(T)를 나타내어 동일하였다. *SspI* 인지부위에서 vv IBDV와 intermediate plus 백신인 CIL은 1011(A)를 나타내어 다른 백신주들의 1011(C)와는 다르게 나타났다. 그러나 이 부위에서 병원성 IBDV 인 STC와 DELE도 1011(C)를 나타내어 이 부위가 병원성의 절대적인 기준은 되지 않는 것으로 보여 다른 부위와 함께 분석되어야 할 것으로 판단된다.

아미노산 서열을 바탕으로 한 phylogenetic tree 분석에서 BU2, JOONG과 DAE strain, CIL과 STC strain은 각각 97.4%의 높은 상동성을 나타내어 같은 IBDV origin 일 것으로 추측된다. 이는 염기서열을 기초로 한 비교에서도 거의 유사하였다. 또한 HAN strain은 좀 더 항원적 특성 구명이 이루어져야겠지만 Solvay 사의 Bursine-2와 같은 IBDV origin 일 것으로 추측되며, 다른 백신주인 G2, HAN, B7, IB strain은 각각 별도의 계통으로 분류되어 이들과는 구별되는 IBDV origin 일 것으로 추측된다.

IBD는 IBD 생바이러스 백신으로 예방하여 왔지만, 생 백신에 의한 모체이행항체로 IBD를 완전히 방어하는 것은 어렵다^{10,17,30}. 너무 높은 수준의 모체이행항체는 절충한 백신에 간섭현상을 일으키고, 너무 낮은 수준은 야외 바이러스의 감염 위험성을 예고한다. 그리고 생백신은 중등도의 F 낭의 위축을 일으키는 등 닭의 체내를 거치는 동안 병원성이 증가하고, 항원성 및 병원성의 특성이 안정되어 있지 않아³¹ 좀더 안전하고 효과적인 IBD 백신이 연구되어야 할 것으로 사료된다.

이상에서 IBDV의 항원성 및 병원성의 변이를 일으키는 VP2 gene의 hypervariable region을 RT/PCR로 증폭한 후 cloning 하여 염기와 아미노산 서열을 분석하는 것은 단시간 내에 IBDV의 항원성과 병원성의 변이를 파악하는데 용이하게 이용될 수 있으며, 국내에서 유행하는 IBDV에 따른 백신 선택에도 도움이 될 것으로 사료

된다. 그리고 각 백신의 특징적인 염기와 아미노산 서열은 IBD 진단시 특징적인 인식지표로 사용될 수 있을 것으로 보이며, 이 부위는 중화항체를 유도하는 항원결정기를 형성하는데 관련이 있어 IBDV 재조합 백신을 생산하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

결 론

국내에서 사용중인 7종(JOONG, HAN, B7, IB, BU2, G2, CIL)의 IBD 백신주에서 VP2 gene의 hypervariable region의 염기와 아미노산 서열을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 국내에서 사용중인 IBD 백신주의 VP2 gene의 hypervariable region을 RT/PCR로 증폭하여 474 bp의 동일한 PCR product를 얻었다.
2. 염기서열 비교 분석에서 국내에서 사용중인 백신주와 국내 분리주(SH/92, K1, 310)와는 84~94%의 상동성을, 백신주들 간에는 서로 88~98%의 상동성을 나타내었다. 아미노산서열 비교 분석에서 국내에서 사용중인 백신주와 국내 분리주와는 81~98%의 상동성을, 백신주들 간에는 서로 80~99%의 상동성을 나타내었다.
3. 아미노산 서열의 비교분석에서 두 hydrophilic region에서 JOONG, BU2, IB strain은 STC strain과 동일하였다. Serine-rich heptapeptide는 intermediate plus 백신인 CIL strain과 attenuated 백신인 HAN strain에서만 보존되었다.
4. 염기 및 아미노산 서열을 바탕으로 한 phylogenetic tree 분석에서 BU2와 JOONG strain은 한 계통으로 분류되었고 이들과 DAE strain은 밀접한 관련이 있었으며, CIL과 STC strain은 한 계통으로 분류되었다. G2, HAN, B7, IB strain은 각각 별도의 계통으로 분류되었다.

참고문헌

1. Hirai K, Shimakura S, Kawamoto E, *et al.* The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. *Avian Dis.* 18:50-57, 1974.
2. Dobos P, Hill BJ, Hallett R, *et al.* Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded genomes. *J Virol*, 32:593-605, 1979.
3. Hudson PJ, McKern NM, Power BE, *et al.* Genomic structure of large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, 14:5001-5012, 1986.
4. Azad AA, Barrett SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 143:35-44, 1985.
5. Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, *et al.* Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 161:145-152, 1987.
6. Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, *et al.* Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol*, 62:1084-1087, 1988.
7. Morgan MM, Macreadie IG, Harley VR, *et al.* Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology*, 163:240-242, 1988.
8. Becht H, Muller H, Muller HK. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen. Virol*, 69:631-640, 1988.
9. Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*. 76:437-443, 1995.
10. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, 9th ed. (Calnek, B.W. ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa, 648-663, 1991.
11. Izawa H, Eiguchi Y, Nagabayashi T. Attenuation of infectious bursal disease virus by serial passage through chicken embryonated eggs and chicken and duck embryonic fibroblasts (author's translation). [Japanese] *Uirusu*, 28:41-45, 1978.
12. Van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol*, 20:133-143, 1991.
13. Brown MD, Green P, Skinner MA. VP2 sequences of recent European vv isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol*, 75:675-680, 1994.
14. Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, *et al.* Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine*, 8:549-552, 1990.
15. Jackwood DH, Saif YM. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 31:766-770, 1987.
16. Okoye JOA. Infectious bursal disease of chickens. *Vet Bull*, 54:425-436, 1984.
17. Ismail NM, Saif YM. Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis*, 35:460-469, 1991.
18. Lin Z, Kato A, Otaki Y, *et al.* Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*, 37:315-323, 1993.
19. Bayliss CD, Spies U, Shaw K, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains entification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 71:1303-1312, 1990.

20. Heine H-G, Haritou M, Failla P, *et al.* Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains *J Gen Virol*, 72:1835-1843, 1991.
21. Kwon HM, Jackwood MW, Brown TP, *et al.* Polymerase chain reaction and biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis*, 37:149-156, 1993.
22. 권혁무, 김대규, 성환우. Infectious bursal disease virus (국내분리주)의 variable VP2 gene의 분석. *대한수의학회지*, 39(3):545-553, 1999.
23. Cao YC, Yeung WS, Law M, *et al.* Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains. *Avian Dis*, 42:340-351, 1998.
24. Dormitorio TV, Giambone JJ, Duck LW. Sequence comparisons of the variable region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis*, 41:36-44, 1997.
25. Kibenge FSB, Jackwood DJ, Mercado CC. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 71:569-577, 1990.
26. Yamaguchi T, Ogawa M, Miyoshi M, *et al.* Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, 142:1441-1458, 1997.
27. Van den Berg TP, Gonze M, Morales D, *et al.* Acute infectious bursal disease in poultry : immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol*, 25:751-768, 1996.
28. Vakharia VN, He J, Ahmad B, *et al.* Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res*, 31:265-273, 1994.
29. Etteradossi N, Arnauld C, Toquin D, *et al.* Critical amino acid changes in VP2 variable domains are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol*, 143:1627-1636, 1998.
30. Tsukamoto K, Tanimura N, Kakita S, *et al.* Efficacy of three live vaccines against highly very virulent infectious bursal disease virus and the optimum vaccination time. *Avian Dis*, 39:218-229, 1995.
31. Muskett JC, Reed NE, Thornton DH. Increased virulence of an infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. *Vaccine*, 3:309-312, 1985.