

국내 사육 꿩에서 분리된 뉴캐슬병 바이러스의 hemagglutinin-neuraminidase(HN) 유전자의 클로닝과 염기서열 분석

장경수, 광길한*, 장승익**, 김지영, 김태용, 송영환, 송희종***, 전무형¹

충남대학교 수의과대학¹, 전라북도축산기술연구소*, 대전광역시보건환경연구원**,
전북대학교 수의과대학 및 생체안전성연구소***
(접수 2002. 4. 20, 게재승인 2002. 5. 10)

Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene
encoding hemagglutinin-neuraminidase (HN) of Newcastle
disease virus isolated from a diseased pheasant in Korea

Kyung-Soo Chang, Kil-Han Kwak*, Seung-Ik Jang**, Ji-Young Kim,
Tae-Yong Kim, Young-Hwan Song, Hee-Jong Song***, Moo-Hyung Jun¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*Chonbuk Livestock Development and Research Institute, Chonju, 560-860, Korea

**Daejeon Metropolitan Health & Environment Research Institute, Daejeon, 305-338, Korea

***Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University,
Chonju, 561-756, Korea

(Received 20 April, 2002, Accepted 10 May, 2002)

Abstract

The gene encoding the HN protein from the CBP-1 strain, a heat stable Newcastle disease virus (NDV) isolated from diseased pheasants in Korea, was characterized by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and the nucleotide and amino acid sequences were analyzed following cloning of the HN gene. In all of the NDV strains studied, a 1.75 kb size cDNA fragment for the HN gene was generated by RT-PCR and smaller specific band sizes harboring the internal portions of the HN gene were also detected by using four pairs of primers. The RT-PCR was sensitive enough to detect viral transcripts when the virus titer was above 25 hemagglutination

이 연구는 한국과학재단 특정연구과제 연구비(과제번호: 97-0402-0801-2; 1997~1999)에 의해 수행되었음.

¹Corresponding author

Phone : 042-821-6753

E-mail : mhjun@cnu.ac.kr

units. The amplified 1.75 kb cDNA was cloned into a *Bam*HI site of the pVL1393 Baculo transfer vector. The nucleotide sequences of the 1,758 bp HN gene from the CBP-1 strain were determined by the dye terminator cyclic sequencing method. The gene sequences were compared among the strains of CBP-1, Texas GB, Beaudette C, LaSota, B1 and Ulster. The homology of the CBP-1 HN gene to other HN variants was 97.8% to Texas GB, 98.4% to Beaudette C, 95.4% to LaSota, 95.6% to B1 and 90.2% to Ulster. As the deduced 577 amino acid sequences were compared among the strains, the homology for CBP-1 HN appeared to be 96.7% to Texas GB, 97.9% to Beaudette C, 95.5% to LaSota, 95.5% to B1 and 92.7% to Ulster. It was evident that the amino acid sequences included 5 sites for N-asparagine linked glycosylation and 12 cysteine residues. The three conserved leucine residues within the predicted transmembrane domain of the HN protein are amino acid 30, 37 and 44. The three antigenic sites on the HN protein of NDV are amino acids 347 (Glu), 481 (Asn) and 495 (Glu). These data indicate that the genotype of the CBP-1 strain is more closely associated with the strains of Texas GB and Beaudette C than it is for the LaSota, B1 and Ulster strains.

Key words : HN gene, NDV isolate, Pheasant, Cloning, Nucleotide sequence

서 론

뉴캐슬병의 원인체인 Newcastle disease virus(NDV)는 *Paramyxoviridae Paramyxovirinae*의 *Rubulavirus*에 속하며 100~150nm 크기의 비리온으로 음극성의 single-stranded RNA 핵산을 가지며¹⁻³⁾, fusion protein(F), hemagglutinin-neuraminidase(HN), matrix protein(M), nucleocapsid protein(NP), phosphoprotein(P) 및 large polymerase protein(L) 6종 주요 virion polypeptide와 2종의 비구조단백으로 구성되어 있다¹⁻³⁾.

NDV는 조류와 사람에 감염하는 인수공통전염병이며, 특히 닭, 꿩, 메추리 등 가금류에 감염되면 소화기, 호흡기 및 신경증상을 나타내고 산란계에서는 산란저하증을 유발하며, 어린 병아리에서는 폐사율이 높아 세계적으로 양계산업에 중요한 급성 전염병으로 간주되고 있다¹⁻³⁾. 우리나라에서는 1927년 닭에 처음 발병 보고된 이래 현재까지 계속 발생되어 제1종 가축전염병으로 규정하고, 백신접종, 검역 및 도태방법에 의한 방역대책을 쓰고 있으나 양계산업에 피해가 큰 전염병이다.

NDV는 단일 혈청형인데도 불구하고 strain

에 따라 생물·물리화학적 성상과 병원성에 차이를 보이며 혈청학적으로 약간의 차이를 나타낸다^{1,2)}. NDV의 이러한 strain별 성상의 차이는 역학적 특성을 이해하는데 매우 중요시되고 있다^{1,2,4)}. NDV는 병원성상에 따라 병원성이 높고 폐사율이 높은 viscerotropic velogenic 형과 neurotropic velogenic 형, 중등도의 병원성을 보이는 mesogenic 형, 그리고 병원성이 매우 낮은 lentogenic 과 asymptomatic 형 NDV로 분류하고 있다^{1,2)}.

뉴캐슬병은 백신 접종 계군에서도 흔히 발생된다. 이러한 계군에서의 발생양상은 성계군의 경우 뚜렷한 증상이나 해부소견을 보이지 않고 산란율의 감소만을 초래하며, 육성계군에서는 호흡기증상과 더불어 장기간에 걸쳐 다양한 폐사율을 보이다가 신경증상을 나타내는 경우가 허다하다^{1,2)}. 또한 발병계군에서의 NDV 분리빈도가 극히 낮고 ND 발병 후 회복기에 혈청검사를 실시하여도 뚜렷한 항체가의 상승을 볼 수 없는 경우가 많으며, 난계대 전염으로 추정되는 ND 발병 사례들도 목격되어 전형적인 ND에 비해 무척 복잡한 양상을 띄고 있다^{1,2)}. 또한 국내에서는 닭 이외에도 꿩, 메추리, 자고새 등 관상조류에서도 뉴캐슬병이 발생되어 피

해를 주고 있고⁷⁾, NDV에 대해 비교적 저항성이 높은 이런 가금류들이 NDV의 생물학적 성상 변화를 초래할 수 있는 한 요인으로 작용할 것으로 예상되고 있어^{1,3,6)}, 분자생물학적인 연구를 통한 유전자형의 구명이 요망되고 있다.

최근 NDV의 생물학적 특성을 분자유전학적으로 구명하기 위해 유전자 염기서열 분석에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, full genome 및 중요한 구조단백 암호 유전자에 대한 연구결과가 보고되고 있다^{6~14,29)}. 최근 Australia-Victoria주⁸⁾, Queensland/66⁹⁾, Texas GB 주¹⁰⁾, Beaudette C주^{9,11)}, Miyadera주¹²⁾, LaSota주와 BI주^{13,28)}, Ulster주¹¹⁾, D26주¹²⁾ 외 여러 분리주^{6,14)}에 대한 F, HN, L, M, P 등의 구조단백과 비구조단백에 대한 염기서열이 밝혀져 있다. 국내에서는 닭에서 분리된 SNU58GG주와 SNU58GS주의 F 유전자에 대한 염기서열 그리고 꿩에서 분리된 내열성 CBP-1주의 F 유전자에 대한 염기서열이 보고된 바 있다¹⁴⁾.

이러한 유전자의 염기서열 분석 결과 NDV주의 생물학적 성상과 병원성 및 항원성에 따라 염기서열에 차이가 있으며, strain간에 유전적 변이가 관찰되었고, 분자역학적 기전 규명에 많은 자료가 제공되고 있다^{6~14)}.

본 연구에서는 1991~1995년에 Park 등^{5,15)}이 충청지역에 사육중인 꿩에서 뉴캐슬병에 이환된 가검물로부터 분리한 수주의 NDV 중 내열성이 있으며, 세포내 증식성상 등 phenotype이 기존 NDV 분리주와 상이한 점이 보고된 CBP 분리주를 공시하였으며, envelope glycoprotein으로 병인기전상 중요한 기능을 하는 HN 단백을 암호하는 유전자를 RT-PCR로 증폭, vector plasmid에 클로닝하고 염기서열을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스

뉴캐슬병에 이환된 꿩으로부터 분리한 다음 SPF 부화계란에서 3~5대 계대증식된 내열성 CBP-1, CBP-2, CBP-3, CBP-4 및 CBP-5주^{5,15)}와 생독백신주로 이용되는 LaSota주와 BI주를

공시하였다. 바이러스는 9~10일령 된 SPF 부화계란의 요막강내에 접종하여 증식하였다^{5,15)}.

2. HN 유전자에 대한 primer

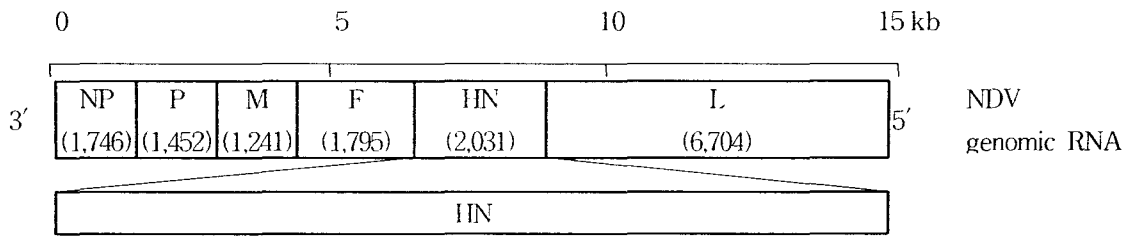
GenBank에서 검색하여 얻은 BI주의 HN 유전자의 염기서열(#U37187)과 Millar 등¹¹⁾의 방법을 참고하여 MacDNAsis ver 3.0 (Hitachi software engineering America Ltd.)을 이용해 작성하였다(Fig 1). HN1 S와 HN4 AS primer는 총 1,758 bp 크기의 HN 유전자의 RT-PCR에 사용하였고, HN1 S와 AS, HN2 S와 AS, HN3 S와 AS 그리고 HN4 S와 AS primer들은 소절편 HN 유전자의 염기서열 분석에 사용하였다.

3. RNA 추출

Acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 추출하였다^{14,16)}. 먼저 400 μ l의 장뇨막강액에 500 μ l의 denaturing solution[Sol D; 4 M guanidium isothiocyanate(Ultra Cure, BRL), 25 mM sodium citrate(pH 7.0, Sigma), 0.5% N-lauryl sarcosine(Sigma), 0.1M 2- β -mercaptoethanol(Sigma)]을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치한 후 2 M sodium acetate(pH 4.5) 50 μ l와 phenol/chloroform/isoamylalcohol(P/C/I 25:24:1 Sigma) 500 μ l를 첨가하여 10분간 교반하고 실온에서 5분간 정치한 후 15,000g로 10분간 원심하여 상층액의 75%를 새로운 시험관으로 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol (Sigma)을 첨가하여 10분간 침전시킨 후 15,000g로 20분간 원심하여 RNA 침전물을 만든 후 300 μ l Sol D로 다시 녹여 300 μ l isopropanol을 첨가하고 15,000g로 20분간 원심하여 RNA 침전물을 만든 후 75% ethanol로 두 번 수세하고 진공건조한 다음 0.1% DEPC용액 10 μ l에 녹였다.

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)

RNA 시료 10 μ l와 sense와 antisense primer 한 쌍씩을 시험관에 각각 1 μ l(200ng)씩 넣고 70



Primers	Sequences	Location
HN1 S	CGCGGATCCCGACAGCAGTCCTCAGTCATG	103nt-123nt
HN1 AS	AGTGCAACCTGATCCTGTAGT	619nt-639nt
HN2 S	GGATCAGGTTGCAC'TCGGATA	625nt-645nt
HN2 AS	CGCGGATCCGTAGACTGAGAACCATACGCG	1,051nt-1,071nt
HN3 S	CGCGGATCCCGCGTATGGTTCTCAGTCTAC	1,051nt-1,071nt
HN3 AS	GGGACTATGAAGAGTGGCTGT	1,423nt-1,443nt
HN4 S	ACAGCCACTCTTCATAGTCCC	1,423nt-1,443nt
HN4 AS	CGCGGATCCACTCAACTAACCAGACCTGGC	1,840nt-1,860nt

Fig 1. Genetic map of the NDV genomic RNA and sequences of four pairs of primers for the NDV HN gene.

℃에 30분간 denaturation 시킨 후 얼음 위에 5분 동안 정치하였다. 여기에 5×reaction buffer [100 mM Tris-HCl(pH 8.3, at room temperature), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Gibco BRL] 6μl, 0.1 M dithiothreitol(DTT) 2μl, 2.5 mM dNTPs(Takara) 4μl, 12.5 units RNAsin (Promega) 0.5μl, 0.1% DEPC-treated H₂O 5μl와 100units의 RNase H-minus superscript II RT(Gibco BRL) 0.5μl를 첨가하고 automated thermal cycler(DNA thermal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co)로 37℃에서 60분간 그리고 42℃에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다^{14,16)}.

합성한 cDNA 10μl에 10×reaction buffer [100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 0.1% gelatin (w/v)] 5μl, 25 mM MgCl₂ 10μl, 2.5 mM dNTPs 8μl, sense와 antisense primer 를 각 1μl와 멸균증류수 14μl를 첨가하여 automated thermal cycler로 94℃에서 5분간 단 백분해 효소를 불활화시킨 후 Taq polymerase (Takara) 1μl(3 units)를 넣어 94℃에서 30초, 46℃에서 30초, 72℃에서 5분 동안 반응하는

일련의 과정을 30회 반복하면서 annealing time과 extension time을 매 cycle마다 2초와 5 초씩 추가하였으며 마지막으로 72℃에서 10분 간 반응시켰다¹⁴⁾.

전기영동분석은 주로 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하였고 image analyzer (Pharmacia)로 판독 분석하였다¹⁶⁾.

5. cDNA cloning

(1) PCR products의 정제

Agarose gel에서 잘라낸 PCR 산물은 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 용출 정제하였다. 용출된 핵산은 UV spectrophotometer(260 nm)로 정량하였다.

(2) Vector 및 insert DNA

pVL1393 Baculo transfer plasmid(Pharmingen)를 대량생산하여 정제한 후 *Bam*HI으로 소화시켜 linear 상태로 만들어 이를 다시 정제하였으며, 자가융합을 억제시키기 위하여 calf intestine alkaline phosphatase(CIAP, Takara)로 56℃에서 1시간 처리한 후 CIAP를 불활화하기

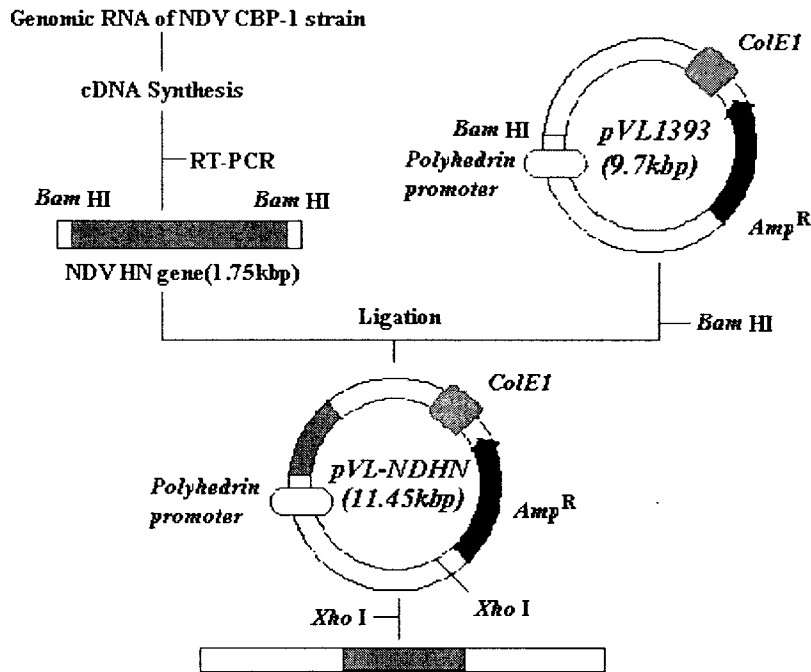


Fig 2. Schematic diagram of the cloning strategies for the CBP-1 HN gene.

위해 65°C에서 1시간 반응시켰으며 P/C/I로 처리하고 에타놀로 침전하여 vector를 준비하였다¹⁶⁾. 또한 용출된 PCR 산물을 30°C에서 1시간 *Bam*HI으로 소화시킨 후 P/C/I로 처리하고 에타놀로 침전하여 insert DNA를 준비하였다 (Fig 2).

(3) Ligation

클로닝할 *Bam*HI으로 처리된 PCR 산물 6 μ l (0.6 μ g)와 10 \times ligation buffer[660 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT] 1 μ l, 10 mM ATP 1 μ l, T4 DNA ligase(Takara) 1 μ l (10 units) 및 *Bam*HI으로 처리된 pVL1393 vector 1 μ l(0.2 μ g)를 넣고 16°C에서 12시간 동안 반응시켰다.

(4) Transformation

DH5 α competent cell은 CaCl₂ 용액 처리방법으로 준비하여 -70°C 초저온 냉동고에 보관하며 transformation에 사용하였다¹⁶⁾.

저장된 competent cell 200 μ l를 얼음 위에서

녹이고 냉각된 1.5ml polypropylene tube에 넣고 10 μ l의 ligation mixture plasmid solution을 첨가해서 잘 섞어 주고 30분 동안 얼음 위에 정치시킨 다음 42°C에서 90초간 열로 충격을 가해 plasmid가 균체 내로 들어가도록 해준 다음 얼음 위에서 2분간 정치하였다. 여기에 0.8 ml SOC 배지를 넣어 37°C에서 강하게 교반 (225 cycles/min)하며 1시간 동안 배양하여 plasmid에 있는 앰피실린 내성 유전자가 발현 되도록 하였다. 앰피실린(50 μ g/ml)이 들어 있는 LB agar plate에 transformation된 균체가 들어있는 200 μ l의 SOC 배지를 구부러진 유리봉으로 골고루 펴주고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하여 백색 집락 10개를 선택하여 앰피실린 (50 μ g/ml)이 첨가된 LB broth에 접종하였다.

(5) Plasmid DNA 추출

LB broth에 접종된 균은 37°C에서 18시간 진탕배양하였다. 배양액을 4,000 rpm에서 10분간 원심하고 침전물을 냉장된 Sol I(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)

200 μ l에 부유시켜 실온에서 5분간 정치하였다. 여기에 Sol II(0.2N NaOH, 1% SDS) 400 μ l을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 다음 얼음에서 5분간 용해시킨 후 냉장된 Sol III(3M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid) 300 μ l를 넣어 혼합하고 5분간 정치하여 중화시킨 다음 12,000 g에서 10분간 원심하고 상층액을 여과한 후 1 volume의 isopropanol을 첨가하여 -70°C에서 30분 침전시킨 후 12,000 g에서 20분간 원심하였다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하여 진공 건조한 다음 30 μ l TER(Tris-EDTA, pH 8.0, 20 μ g/ml RNase)을 넣어 용해하였다. Insert가 들어가 있을 것으로 예상되는 plasmid는 *Bam*HI (10 units, Takara)로 처리하여 insert의 유무를 확인하였다.

6. Dye terminator cycle sequencing

염기서열 분석은 Dye terminator cycle sequencing법으로 실시하였다¹⁴⁾. 약술하면 Dye terminator ready reaction mix(Perkin-Elmer, USA)는 A-dye terminator, C-dye terminator, G-dye terminator, T-dye terminator, dTTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl, MgCl₂, thermal stable pyrophosphatase와 amplitaq DNA polymerase-FS로 구성되어 있으며 두 개의 분리된 dye terminator cycle reaction으로 수행하고, forward primer는 positive sequence를 위해 reverse primer는 complement sequence를 위해 사용하였다.

PCR tube에 8.0 μ l dye terminator ready mix(Perkin-Elmer), 2 μ l DNA template, 각 3.2 pmol의 forward와 reverse primer를 첨가해 총량을 20 μ l로 만든 후 DNA thermal cycler에서 96°C에서 30초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분 동안 denaturation, annealing과 polymerization과정을 25회 반복하였다.

Sequence data는 ABI prism 310 genetic analyzer(Perkin-Elmer Cetus Co)로 수집한 후 collection, analysis 및 seqEd software(Perkin-Elmer, USA)가 설치된 Macintosh로 분석하였으며, raw sequencing data는 collection software로 수집하였으며, analysis software를 이

용하여 nucleotide sequences로 전환하였다.

7. Data analysis

SeqED software를 이용하여 핵염기서열로부터 아미노산서열을 결정하였으며, CBP-1주와 비교하기 위해 GenBank로부터 LaSota (#U37190), B1 (#U37187), Texas GB(#A91144), Beaudette C(AF309036) 및 Ulster(#M19478)주에 대한 HN 유전자 염기서열을 획득하여 SeqED software를 이용하여 multialign에 의해 분석하였다.

결 과

1. RT-PCR에 의한 HN 유전자 증폭 (HN 유전자 증폭)

HN1 S primer와 HN4 AS primer를 이용하여 SPF 발육계란의 장노액강에서 증식된 LaSota, B1, CBP-1, CBP-2, CBP-3, CBP-4 및 CBP-5주에 대해 RT-PCR법으로 1,758 bp의 HN 유전자를 증폭시킨 결과 Fig 3에서 나타난 바와 같이 모두 HN 유전자로 예상되는 1.75kb의 PCR 산물로 인정되었다. CBP주의 prototype인 CBP-1의 혈구응집능에 대한 바이러스 농도별 PCR 산물의 생성능을 비교한 결과 혈구응집역가가 2⁵ HAU 이상일 때 특이적인 밴드가 관찰되었고, 2⁴ HAU 이하일 때는 밴드의 구분이 불명확하였다(Fig 4).

4쌍의 primer 즉 HN1, HN2, HN3 및 HN4 primer 쌍을 이용하여 CBP-1주에 대해 RT-PCR를 실시한 결과 Fig 4에서 나타난 바와 같이 536, 446, 392 및 437bp의 HN1, HN2, HN3 및 HN4 소분절을 증폭시킬 수 있었다(Fig 5).

2. HN 유전자 클론닝

HN1 S primer와 HN4 AS primer를 이용하여 RT-PCR로 증폭된 CBP-1주의 HN 유전자를 *Bam*HI으로 처리하여 얻어진 DNA 단편을 *Bam*HI으로 처리된 pVL1393 Baculo transfer vector에 융합시킨 다음(이후 이 plasmid를 pVL-NDHN이라 칭함), DH5 α competent cell

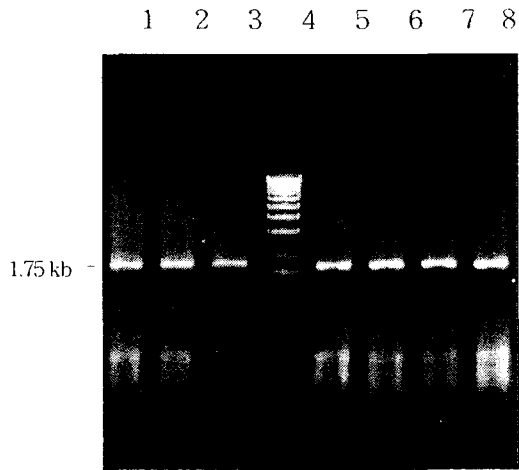


Fig 3. Amplification patterns of the HN genes by RT-PCR using an HN1 S and HN4 AS primers.
Lane 1: B1, Lane 2: LaSota, Lane 3: CBP-1, Lane 4: 1kb DNA ladder marker, Lane 5: CBP-2, Lane 6: CBP-3, Lane 7: CBP-4, Lane 8: CBP-5

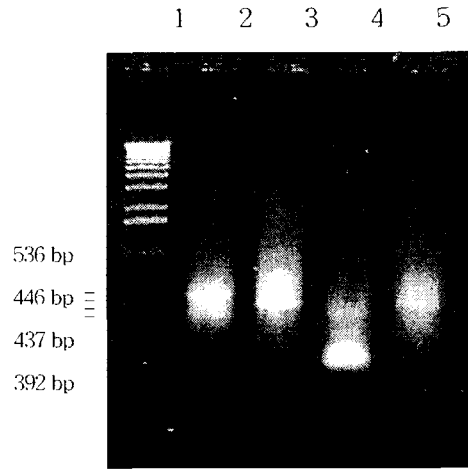


Fig 5. Amplification patterns of the HN gene of CBP-1 strain by RT-PCR using four pairs of primers.
Lane 1: HN1 S and HN4 AS primers, Lane 2 : 1kb DNA ladder marker, Lane 3: HN1 primer pairs, Lane 4: HN2 primer pairs, Lane 5: HN3 primer pairs, Lane 6: HN 4 primer pairs

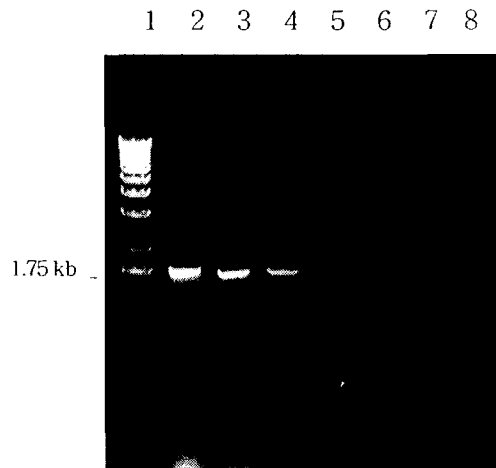


Fig 4. Amplification patterns of the HN genes by RT-PCR for the virus with various hemagglutination unit(HAU).
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker, Lane 2: 2^{10} HAU, Lane 3: 2^9 HAU, Lane 4: 2^8 HAU, Lane 5: 2^7 HAU, Lane 6: 2^6 HAU, Lane 6: 2^5 HAU, Lane 6: 2^4 HAU

에 transformation시키고 앰피실린이 첨가된 LB agar를 이용하여 스크리닝하였다. 선택된 집락은 LB broth에 배양하고 miniprep으로 plasmid DNA를 추출한 다음 *Bam*HI으로 처리하고 1% agarose gel에 전기영동한 결과, *Bam*HI으로 절단시 1.75kb의 insert DNA와 9.7kb의 vector DNA를 확인할 수 있었다(Fig 6). Insert DNA를 확인한 후 plasmid를 *Xho*I으로 처리하여 linear DNA로 만든 후 Centri-spin column(Takara)을 이용하여 정제한 후 DNA 염기분석용 template로 사용하였다.

3. CBP-1주의 HN 유전자 염기서열

Dye terminator cycle sequencing법에 의해 CBP-1의 HN 유전자의 ATG codon의 upstream 120 bp로부터 1,854번째 TGA termination codon의 downstream 177 bp까지 위치하는 2,031 bp중 103 bp부터 1,860 bp까지 1,758 bp의 염기서열을 결정하고 Texas GB,

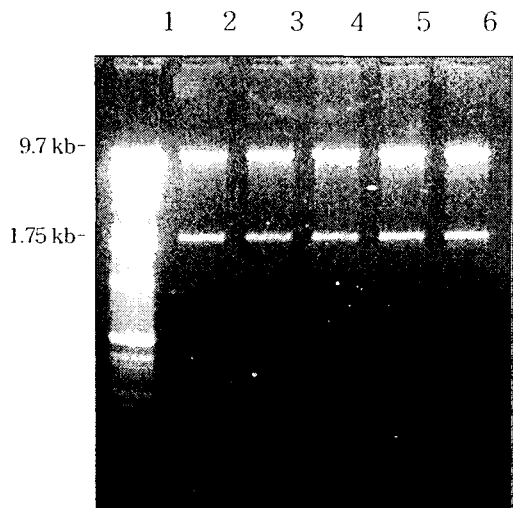


Fig 6. Cleavage patterns of pVL-NDHN digested with *Bam*HI.
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker,
Lane 2-6: pVL-NDHN/*Bam*HI

Beaudette C, LaSota, B1 및 Ulster주의 HN 유전자와 비교한 결과, Texas GB주와는 38개의 염기에 차이를 보여 97.8%, Beaudette C주와는 28개 부위에서 차이를 보여 98.4%, LaSota주와는 81개 부위의 염기가 달라서 95.4%의 상동성을 보였고, B1주와는 77개 부위에서 차이를 보여 95.6% 그리고 Ulster주와는 172개의 염기에 차이를 보여 90.2%의 상동성을 보였다. 이러한 결과를 토대로 CBP-1주의 HN 유전자는 LaSota, B1 및 Ulster주의 HN 유전자보다는 Texas GB 및 Beaudette C주의

HN 유전자와 보다 높은 상동성을 보유하고 있음이 시사되었다(Table 1).

4. HN 단백질의 아미노산 서열 비교

HN 유전자 염기서열 분석에서 얻어진 결과를 기초로 하여 HN 단백질에 대한 아미노산 서열을 추정한 결과 Fig 7에 나타난 바와 같이 553개의 아미노산으로 결정되었다. 이 결과를 Texas GB, Beaudette C, LaSota, B1 및 Ulster주와 비교해본 결과 HN 단백질의 아미노산은 Texas GB주와는 96.7%, Beaudette C주와는 97.9%, LaSota와 B1주와는 각각 95.5%, 그리고 Ulster주와는 92.7%의 상동성을 각각 보여, CBP-1주의 HN 단백질은 LaSota, B1 및 Ulster주의 HN 단백질에 비해 Beaudette C 및 Texas GB주의 HN 단백질에서 보다 높은 상동성을 나타내었다(Table 1). 또한 5개의 N-asparagine-linked glycosylation site와 12개의 cysteine 잔기가 잘 보존되어 있었다. 그리고 HN 단백질의 transmembrane region(membrane-spanning region)의 30, 37 및 44번째의 아미노산에 각각 leucine 잔기를 함유하고 있어 leucine zipper motif가 인정되었으며 3개의 항원부위 즉 아미노산 347(antigenic site I, Glu), 아미노산 481(antigenic site IV, Asn) 및 아미노산 495(antigenic site II, Glu)가 관찰되었으며 HN amino acid sequence 공통부분인 399 아미노산부터 404 아미노산 사이의 아미노산 서열이 Gly-Ala-Glu-Gly-Arg-Ile(G-A-E-G-R-I)로 구성되어 있었다.

Table 1. Comparison of nucleotide and amino acid sequence homology of the HN gene among four strains of Newcastle disease virus

Viruses	Nucleotide sequence	Homology	Amino acid sequence	Homology
Texas GB/CBP-1	1,720 / 1,758	97.8%	558 / 577	96.7%
Beaudette C / CBP-1	1,730 / 1,758	98.4%	565 / 577	97.9%
LaSota / CBP-1	1,677 / 1,758	95.4%	551 / 577	95.5%
B1 / CBP-1	1,681 / 1,758	95.6%	551 / 577	95.5%
Ulster / CBP-1	1,586 / 1,758	90.2%	535 / 577	92.7%

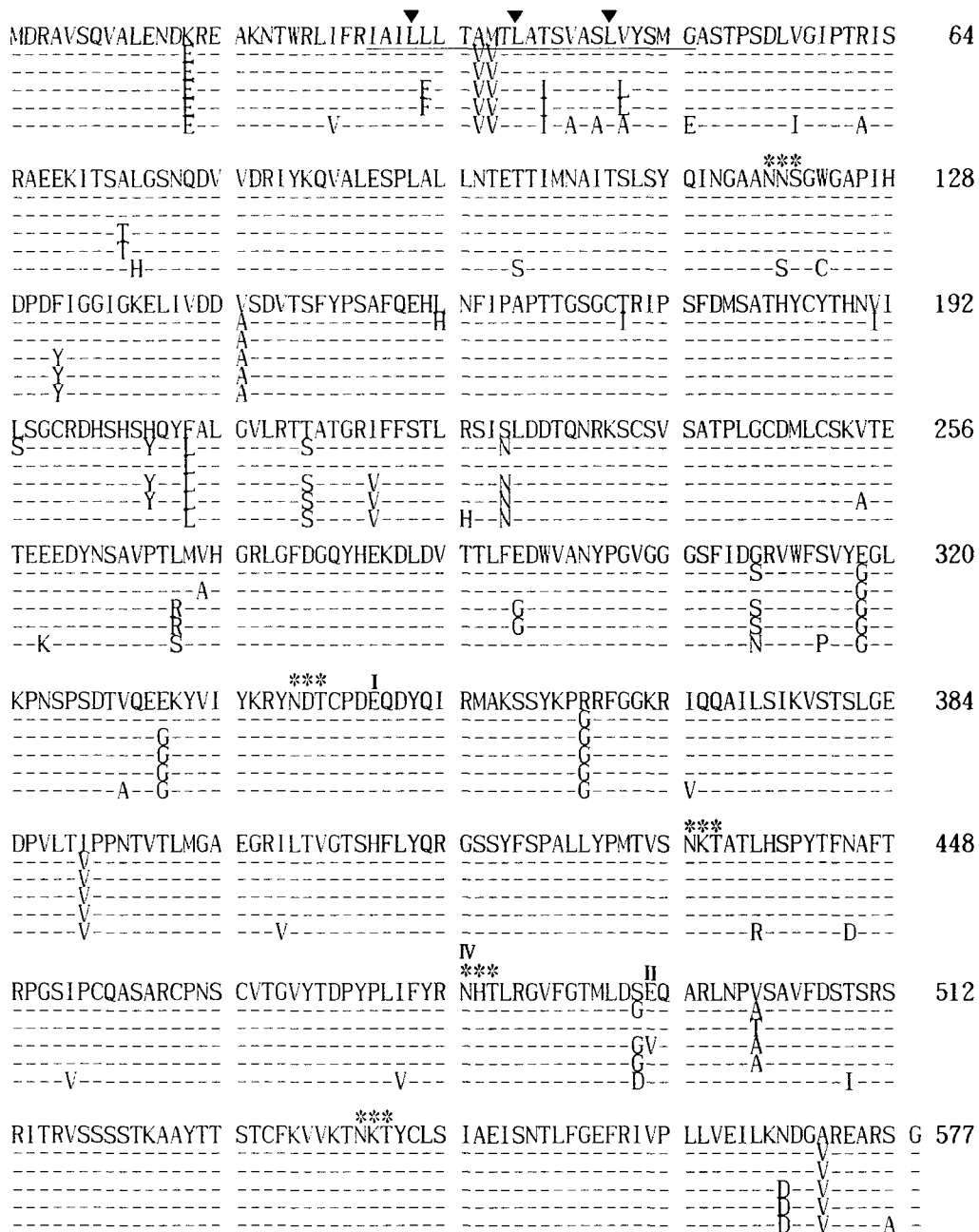


Fig 7. Alignment of the deduced amino acid sequences of the HN proteins among various NDV strains including the CBP-1 strain. Amino acid sequences of the membrane-spanning region are underlined and the three conserved leucine residues within the transmembrane domain are denoted by arrowheads. The amino acid positions of antigenic sites are indicated by I, II, and IV, respectively. The five potential asparagine-linked glycosylation sites (N-X-S/T; where X is any amino acid except proline and cysteine) are denoted by asterisks. Lines 1 to 6 show the deduced amino acid sequences of the HN protein of CBP-1, Texas GB, Beaudette C, LaSota, B1, and Ulster strains, respectively.

고 찰

뉴캐슬병은 닭, 꿩, 메추리 등 가금류에 감염하면 소화기, 호흡기 및 신경증상을 나타내고 산란계에서는 산란을 감소가 일어난다. NDV 중 velogenic strain은 병원성이 강하고 폐사율이 높아 방역이 부실할 경우 양계산업에 많은 피해를 준다¹⁻⁴⁾. 본 병은 국내 양계산업에서 가장 고질적인 전염병으로 간주되고 있으며, 최근에는 집단사육하고 있는 꿩과 메추리에서도 유행성으로 발병하며 사육농가에 많은 경제적 피해를 주고 있다^{5,14,15)}. 또한 본 병은 인수 공통전염병으로 사람에게 감염하여 인플루엔자양 발열과 결막염 그리고 인두염을 유발하기도 하여 공중보건학적으로도 중요시되고 있다²⁾.

따라서 본 병의 원인체인 NDV의 생물학적 및 생화학적 특성, 병인기전 및 분자유전학적 특성에 관한 연구가 다양하게 수행되어 왔으며¹⁻³⁾, 본 병 방역을 위한 진단기법 및 백신 개발에 대한 연구가 수행되고 있다⁴⁻⁶⁾. 특히 최근 NDV의 유전자 염기서열 분석에 의한 바이러스의 특성연구에 병행하여 분자역학 및 분자유전학적 진단법이 실용화되고 있으며, 유전자 재조합백신 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾.

본 연구에서는 국내에서 사육 중인 꿩에서 분리한 NDV CBP주를 공시하여 RT-PCR기법을 확립하고, HN 유전자의 염기서열을 구명하며, baculovirus expression vector system을 이용하여 HN 단백을 진핵세포에서 발현하기 위한 전단계 과정으로 HN 유전자의 클로닝을 수행하였다. 본 시험에 공시한 CBP 분리주의 임상병리학적, 생물학적 및 물리화학적 성상, 항원성 및 면역원성에 대해서는 Park 등^{5,15)}이 보고한 바 있었다. 본 연구에서는 5주의 CBP주와 LaSota 및 B1 백신주에 대해 RT-PCR을 수행하였던 바 Colman 등⁷⁾의 성적과 유사한 특이 밴드를 관찰할 수 있었으며, 본 시험에서 제작한 primer들이 감수성과 특이성이 높아 NDV의 검색과 진단에 활용할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 재조합 pVL-NDHN 유전자를 DI15 α cell에 클로닝 하였으며, 제한효소

처리에 의해 insert DNA를 확인할 수 있었으며(Fig 6), 추후 Sf9 cell을 이용한 HN 단백질 발현시험에 이용할 계획으로 있다.

최근 NDV의 특성을 분자유전학적으로 구명하기 위해 NDV 구조단백 유전자 염기서열 분석에 관한 연구결과가 많이 보고되고 있다. 본 연구에서는 NDV의 envelope 지질면 밖으로 돌출한 두 개의 표면 glycoprotein으로 virion을 숙주 세포 표면에 존재하는 sialic acid-함유 receptor 분자에 부착시켜 F 단백을 중계해주는 기능과 receptor 파괴 기능(neuraminidase 활성)이 있으며, F 단백질과 함께 바이러스의 병원성과 면역원성에 밀접한 기능을 하는 HN 단백을 암호하는 HN 유전자에 대한 일련의 연구를 수행하였다²¹⁻²⁵⁾. HN 유전자는 Australia-Victoria주^{8,26)}, Queensland/66주^{9,27)}, Texas주와 Texas GB주¹⁰⁾, Beaudette C주¹¹⁾, B1주^{13,28)}, LaSota주¹³⁾, Ulster주¹¹⁾, D26주¹²⁾에 대해 보고된 바 있으며, strain 특성에 따라 다양한 염기구조를 가진 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

본 연구에서 얻어진 CBP-1주의 HN 단백질 암호 유전자의 염기서열과 아미노산 구조를 분석한 결과를 보면 CBP-1주는 염기서열에서 Texas GB와 Beaudette C주와 97.8%~98.4%의 상동성을 보였으며, 아미노산 서열 비교에서도 CBP-1주는 Texas GB와 Beaudette C주와 각각 96.7% 및 97.9%의 상동성을 나타내어 백신주인 LaSota, B1 및 Ulster보다 높았다. 이러한 결과는 Park 등^{5,15)}이 보고한 CBP-1주의 발육계란 치사시간, 1일령 병아리의 뇌내 병원성지수, 6주령 닭에서 정맥내 병원성 지수 및 총배설강 접종시 평균치사시간 등에 대한 병원성시험 결과와 Chang 등¹⁴⁾이 CBP주의 F 유전자 분석 결과와 유사한 경향을 보였다.

한편 HN 유전자 서열에서 추정된 577개의 아미노산 서열을 분석한 바, N-asparagine-linked glycosylation site는 CBP-1주에서 5개로 나타나 Texas GB, LaSota 및 B1주와 일치하였다³⁰⁾. 또한 단백질구조에 중요한 역할을 하는 cysteine 잔기는 CBP-1에서 12개가 관찰되어, 14개로 보고된 Ulster, D26 및 Miyadera주를 제외한 다른 strain과는 일치하였다. 또한

transmembrane region(membrane-spanning region)의 아미노산 30, 37 및 44에 각각 leucine 잔기를 함유하고 있어 Sakaguchi 등²⁷⁾의 결과와 일치하였으며, 3개의 항원부위 즉 아미노산 347(antigenic site I, Glu), 아미노산 481(antigenic site IV, Asn) 및 아미노산 495(antigenic site II, Glu)가 관찰되어 Gotoh 등¹²⁾이 HN 단백질에 3개의 독특한 항원부위가 있다고 지적한 사실이 확인되었다. 병원성 주에 많이 인정되는 서열부위 399nt-404nt에 [Gly-Ala-Glu-Gly-Arg-(Leu/Ile)]이 관찰되어^{1,24)} CBP-1주가 중병원성 바이러스라고 추정할 수 있었다.

결 론

뉴캐슬병에 이환된 꿩으로부터 분리한 Newcastle disease virus(NDV) 내열성주 CBP-1의 envelope glycoproteins의 일종인 hemagglutinin-neuraminidase(HN) protein을 암호하는 유전자의 성상을 구명하기 위해, HN 유전자를 RT-PCR로 증폭하고, 클로닝하여 핵염기 및 아미노산서열을 분석하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

RT-PCR 시험에서 공시한 모든 NDV에서 1,758 bp (1.75 kb) 크기의 HN 유전자 cDNA를 증폭할 수 있었으며, 공시한 4쌍의 primer에서도 특이 소분절 밴드가 관찰되었다. 바이러스 농도별 PCR의 감수성을 비교한 바 혈구응집역가 2⁵ HAU 이상일 때 특이 밴드가 나타났고, 2¹ HAU 이하에서는 관찰되지 않았다. 증폭된 HN 유전자를 pVL1393 Baculo transfer vector의 BamHI site에 삽입하여 클로닝하여 확인하였다.

Dye terminator cyclic sequencing법으로 CBP-1주의 HN 유전자 (1,758 bp)의 염기서열을 밝혔으며 이 결과를 Texas GB, Beaudette C, LaSota, B1 및 Ulster주의 각 HN 유전자 염기서열과 비교 분석한 바 97.8, 98.4, 95.4, 95.6 및 90.2%의 상동성을 나타내었다. 또한 결정된 염기서열에서 추정하여 얻어진 577개의 HN 단백질 아미노산 서열을 Texas GB, Beaudette C, LaSota, B1 및 Ulster주의 각 HN 단백질 아미노

산 서열과 비교한 바 96.7, 97.9, 95.5, 95.5 및 92.7%의 상동성을 나타냈다. 또한 5개의 N-asparagine-linked glycosylation site가 관찰되었으며, 12개의 cysteine 잔기가 인정되었다. 그리고 HN 단백질의 transmembrane region(membrane spanning region)의 아미노산 30, 37 및 44에 각각 leucine 잔기를 함유하고 있어 leucine zipper motif가 인정되었으며, 3개의 항원부위 즉 아미노산 347(Glu), 아미노산 481(Asn) 및 아미노산 495(Glu)가 관찰되었으며, HN amino acid sequence 공통부분인 399 아미노산부터 404 아미노산 사이의 아미노산서열이 Gly-Ala-Glu-Gly-Arg-Ile(G-A-E-G-R-I)로 구성되어 있었다. 이 시험의 결과 NDV 내열성 CBP-1주의 HN 단백질의 핵염기 및 아미노산 서열은 Texas GB 및 Beaudette C주와 유사한 것으로 인정되었다.

참고문헌

1. Alexander DJ. 1997. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections, In: *Diseases of Poultry*(10th Ed) edited by Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, et al. Iowa State Univ. Press Ames, USA : 541~569.
2. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals*(5th Ed). Comstock Pub Ass Cornell University, Ithaca : 790~831.
3. Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, et al. 1993. Paramyxoviridae. In: *Veterinary virology* (2nd Ed), Academic Press Inc, SanDiego : 471~488.
4. Iorio RM, Bratt MA. 1984. Monoclonal antibodies as functional probes of the HN glycoprotein of NDV : Antigenic separation of the hemagglutinating and neuraminidase sites. *J Immunol* 133 : 2215~2219.
5. Park JW, Chang KS, Jun MH. 1995.

- Studies on incidence and isolation of Newcastle disease virus in pheasant flocks. *Kor J Vet Publ Hlth* 19 : 215~224.
6. Chang PC, Hsieh ML, Shien JH, *et al.* 2001. Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *J Gen Virol* 82 : 2157~2168.
 7. Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. 1993. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 67 : 2972~2980.
 8. McGinnes LW, Morrison TG. 1994. The role of the individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus. *Virology* 200 : 470~483.
 9. Toyoda T, Sakaguchi T, Gotoh B, *et al.* 1989. Newcastle disease virus evolution : II. Lack of gene recombination in generation virulent and avirulent strains. *Virology* 169 : 273~282.
 10. Schaper, UM, Fuller FJ, Ward MD, *et al.* 1988. Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent, neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Virology* 165 : 291~295.
 11. Millar NS, Chambers P, Emmerson PT. 1986. Nucleotide sequence analysis of the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 76 : 1917~1927.
 12. Gotoh B, Sakaguchi T, Nichikawa K, *et al.* 1988. Structural features unique to each of the three antigenic sites on the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Virology* 163 : 174~182.
 13. De Leeuw O, Peeters B. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus : Evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* 80 : 131~136.
 14. Chang KS, Jun MH, Song HJ, *et al.* 1998. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding F protein of the thermostable Newcastle disease virus isolated from a diseased pheasant. *J Korean Soc Virol* 28 : 233~245.
 15. Park JW, Chang KS, Cho SW, *et al.* 1997. Pathogenicity and antigenic differences of Newcastle disease virus isolated from pheasants. *Kor J Vet Publ Hlth* 21 : 299~308.
 16. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd Ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 17. Cosset FL, Bouquet JF, Drynda A, *et al.* 1991. Newcastle disease virus(NDV) vaccine based on immunization with avian cells expressing the NDV hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* 185 : 862~866.
 18. Edbauer C, Weinberg R, Taylor J, *et al.* 1990. Protection of chickens with a recombinant fowlpox virus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 179 : 901~904.
 19. Murakami Y, Kagino T, Niikura M, *et al.* 1994. Characterization of Newcastle disease virus envelope glycoproteins expressed in insect cells. *Virus Res* 33 : 123~137.
 20. Karaca K, Sharma JM, Winslow BJ, *et al.* 1998. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFM and Newcastle disease virus HN and F genes : influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch admin-

- istration of recombinant viruses. *Vaccine* 16 : 1496~1503.
21. Deng R, Wang Z, Glickman RL, *et al.* 1994. Glycosylation within an antigenic site on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus interferes with its role in the promotion of membrane fusion. *Virology* 204 : 17~26.
 22. Garten W, Kohama T, Klenk HD. 1980. Proteolytic activation of the haemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus involves loss of a glycopeptide. *J Gen Virol* 51 : 207~211.
 23. Heminway BH, Yu Y, Galinski MS. 1994. Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res* 31 : 1~16.
 24. Horimoto T, Kawaoka Y. 1995. The hemagglutinin cleavability of a virulent avian influenza virus by subtilisin-like endoproteases is influenced by the amino acid immediately downstream of the cleavage site. *Virology* 210 : 466~470.
 25. Hu X, Ray R, Compans RW. 1992. Functional interaction between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J Virol* 66 : 1528~1534.
 26. McGinnes L, Sergel T, Morrison T. 1993. of the HN protein of Newcastle disease Mutations in the transmembrane domain virus affect the structure and activity of the protein. *Virology* 196 : 101~110.
 27. Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, *et al.* 1989. Newcastle disease virus evolution : I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 169 : 260~272.
 28. Seal BS, King DJ, Bennett JD. 1996. Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of the hemagglutinin-neuraminidase protein gene. *Vaccine* 14 : 761~766.
 29. Seal BS, King DJ, Bennett JD. 1995. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J Clin Microbiol* 33 : 2624~2630.
 30. Sagrera A, Cobaleda C, Gonzalez De Buitrago JM, *et al.* 2001. Membrane glycoproteins of Newcastle disease virus: nucleotide sequence of the hemagglutinin-neuraminidase cloned gene and structure/function relationship of predicted amino acid sequence. *Glycoconj J* 18 : 283~289.