

## A Study on DNA Sequences and Mutation of Integrase Region of Korean-type Bovine Leukemia Virus (BLV) *pol* Gene

Oh-Sik Kwon<sup>1†</sup>, Jung-Soon Kang<sup>2</sup>, Hyun-Jin Park<sup>3</sup> and Min Yoo<sup>4</sup>

<sup>1†</sup>Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Molecular Structure Unit, KRIBB, Daejeon, 305-333, Korea

<sup>3</sup>Radiation Cytogenetics Team, Radiological & Medical Sciences Research Center

Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul, 139-706 Korea,

<sup>4</sup>Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Bovine leukemia virus (BLV) is a causative agent for lymphoma disease in cattle including cows worldwide. BLV shares similar virion structure and characteristics with other retroviruses. The *pol* gene of the BLV genome produced reverse transcriptase (RT) and integrase (IN) for important roles for BLV genome integration into host cell chromosomes that is known to be coded in the 3' side of the BLV *pol* gene (one third portion). In this study, we have sequenced 978 bp in the 3' side of the BLV *pol* gene from BLV 10C3 in order to determine the BLV IN region of it. And we compared it to the nucleotide sequences of an Australian BLV isolate. As a result, nucleotide sequences of the IN region of the Korean-type BLV *pol* gene were mutated at a rate of 3.7%. We can confirm that the typical mutations are such as Arg (AGG) → Lys (AAG), Thr (ACG) → Met (ATG), Ile (ATT) → Val (GTT), Asn (ACC) → His (CAC), Phe (TTT) → Leu (TTG) and Asn (ACC) → Asp (GAC). From the analysis of the sequencing data, we were able to determine the zinc-finger-like "HHCC" motif in the amino terminus of BLV IN, that was H-X<sub>3</sub>-H-X<sub>25</sub>-C-X<sub>2</sub>-C. It was also found the DD35E motif in the IN catalytic domain as D-X<sub>56</sub>-D-X<sub>35</sub>-E. It fits very well to the consensus sequences of retroviral IN as well as HHCC motif.

**Key Words:** BLV, *pol* gene, Integrase, IN, Mutation, HHCC, DD35E

### 서 론

소 백혈병은 젖소를 포함한 소에서 가장 흔히 발생하는 임파구 종양성 질병이다. 이는 성우의 대표적인 전염성 질병으로 retrovirus인 소 백혈병 바이러스 (bovine leukemia virus, BLV)에 의해 야기되며<sup>18)</sup> 전세계적으로 발생하고 있으나 이의 발생률은 지역적으로 차이가 심한 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>.

BLV는 구조적 특성으로 인하여 C-형 *Oncornavirinae*로 분류되고 있으나 전형적인 암 유전자를 가지고 있지 않으며 인간의 임파종 역전사효소 바이러스인 HTLV-I/II와 분자적 성격, 계놈의 구조 및 형태가 유사하다<sup>15)</sup>. BLV는 비리온 내에 2개의 동일한 단쇄 선형인 약 8.4 kb 뉴클레오티드의 (+)

sense RNA를 갖지만, 이것이 숙주세포 내에서는 염색체에 통합되어 provirus 상태인 복쇄 DNA로 존재한다<sup>1)</sup>. BLV 계놈은 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3' 구성을 갖는데 *pol* gene은 2,599 bp로 역전사효소 (RT)와 통합효소 (IN)를 암호화하고 있다. 역전사효소와 통합효소는 바이러스 mRNA를 DNA로 바꾸어 주며 바이러스 감염 후 숙주세포에 provirus DNA 상태로 통합할 수 있게 하여 지속적 감염을 가능케 하는 가장 중요한 retroviral 효소들이다<sup>6,17,19)</sup>. 특히 RT는 primer를 이용하여 테옥시뉴클레오사이드 5'-삼인산을 연결시켜서 이중가닥의 DNA-RNA를 생성하기 위해 RNA 분자를 복사하며, DNA-RNA 혼성체에서 RNA를 분해시켜서 상보적인 DNA 가닥의 합성을 개시하는 RNA 내부 핵산가수분해효소 활성 (e.g., RNase H)을 가진다<sup>19)</sup>.

한편 *pol* gene의 3' 영역에는 이 유전자의 3분의 1의 크기를 점유하는 integrase (IN) 유전자가 존재하는데<sup>2,6)</sup>, 이의 산물은 viral ds DNA를 세포의 염색체 DNA에 공유결합으로 연결하여 통합시킨다. 이것은 viral DNA의 3'에 대한 내부 핵산가수분해효소 활성을 포함하는 것으로 표적 DNA의 절

\*논문 접수: 2004년 1월 20일

수정재접수: 2004년 2월 9일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 권오식, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000번지, 계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Tel: 053-580-5539, Fax: 053-585-6949

e-mail: biv@kmu.ac.kr

단과 세포성 DNA에 바이러스를 연결하는 연결효소 기능을 갖고 있다<sup>4)</sup>. 그리고, 숙주세포의 DNA에 통합된 바이러스는 세포를 파괴시키지 않고 증식형 감염을 나타내는데 virus DNA가 숙주세포의 RNA 중합효소 II에 의해서 바이러스 RNA와 mRNA로 전사되어 증식하게 된다. 통합된 바이러스의 DNA는 5' TG와 3' CA 말단을 가지는 것으로 보아 공통적인 통합 기작이 있음을 나타낸다<sup>19)</sup>.

바이러스 유전자가 숙주세포에 통합되고 나면 provirus DNA는 세포분열에 영향을 끼치지 않고 딸세포로 전달되며 완전한 바이러스 입자를 생산하게 된다. 이렇듯 *pol gene*의 산물은 바이러스 복제에 있어서 중심적인 역할을 하기 때문에 많은 retrovirus의 *pol gene* 염기서열이 비교 연구되어 왔다. 특히 *pol gene*은 아주 보존적인 불변부 염기서열을 갖고 있으며 이 부분의 RT와 IN의 아미노산 서열은 바이러스 복제 기전에 중요한 역할을 하고 있음<sup>9,10)</sup>이 알려져 있다.

본 연구에서는 한국형 BLV의 정체를 밝혀내는 일환으로 *pol gene*의 3' 영역에 위치하고 있는 BLV IN 유전자의 염기서열을 결정하고 그 성질을 규명하고자 하였다. 특히 BLV 계놈의 염기서열에 대한 연구는 미국과 호주를 비롯한 선진국에서만 이루어지고 국내에서는 없기 때문에, 우리나라에 전파되고 있는 한국형 BLV의 IN에서의 돌연변이 정도를 호주형 BLV의 IN과 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. PBMC 분리 및 DNA extraction

본 연구를 위하여 BLV에 감염된 것으로 추정된 12마리의 젖소에서 혈액을 채취해 혈청과 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)를 분리하였다. BLV를 포함한 *Oncornavirinae*는 숙주세포에 provirus 상태로 존재하기 때문에 BLV의 감염여부를 확인하는 첫 번째 방법으로 채취한 혈액에서 혈청과 PBMC를 분리하였다. 먼저, sodium heparin 투브에 담긴 10 ml의 fresh blood에 동량의 1X HBSS를 넣고 50 ml 원심분리관에서 잘 섞은 후, 이중 7 ml를 3 ml의 Histopaque-1077 (Sigma) 용액이 든 15 ml 원심분리관에 파스퇴르 피펫을 이용하여 조심스럽게 중충하였다. 이를 냉장 원심분리 (2,500 rpm/20 min)하여 투브 중간에 있는 PBMC 층을 2 ml 걷어내고 1X HBSS로 두 번 세척한 후 다시 원심분리하여 PBMC를 침전시켰다.

### 2. PBMC chromosomal DNA 추출

Phenol/chloroform 추출 방법<sup>16)</sup>을 이용하여 분리한 PBMC에서 genomic DNA를 추출하였다. 먼저, PBMC가 들어 있는 15 ml 원심분리관에 DNA lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.5% SDS; 200 µg/ml pro-

teinase K)를 첨가하여 실온에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포가 용해된 투브에 phenol/chloroform (50:50) 용액을 동량으로 넣어 잘 섞은 후 2,500 rpm에서 30분간 냉장 원심분리하여 상청액을 새 15 ml 투브에 모았다. 이 상청액은 다시 phenol/chloroform으로 처리하고 chloroform (100%)과 혼합용액을 만들어 원심분리 하였다. 얻어진 상청액은 RNase (10 mg/ml)로 처리하고 최종적으로 얻어진 PBMC genomic DNA의 순도를 spectrophotometer로 확인하였다. 각각의 genomic DNA는 T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.3)에 500 µg/ml의 농도로 준비해 -20°C에 저장하여 사용하였다.

### 3. Polymerase chain reaction

PCR 반응에 사용된 primer들은 알려진 일본형 및 서구형 BLV *pol gene* 불변부 영역의 염기서열로 합성된 일련의 primers (Table 1)로서 100 pmol/µl 농도로 사용하였다. 사용된 PCR 반응용액의 구성성분은 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 40 mM dNTP, oligonucleotide primers (200 pmol씩), 2 unit *Taq* DNA polymerase, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O 및 DNA 용액을 포함하여 전체 반응액을 50 µl로 만든 후 mineral oil (Sigma)을 더했다. PBMC genomic DNA는 실험 목적에 따라 그 양을 1.0~4.0 µg/reaction으로 조절하여 준비된 PCR 반응용액과 잘 혼합하여 thermal cycler (Perkin-Elmer Model 480)로 반응시켰다. 반응 cycle은 반응 최적화를 위해 95°C에서 7분간 denaturation시킨 후 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 모두 45회 반복하였으며, PCR DNA의 완성을 돋기 위해 72°C에서 10분간 반응을 연장시켰다. Denaturation 과정은 *Taq* DNA polymerase를 제외한 나머지 PCR 반응액을 넣고 진행하였는데 5분이 경과한 후 PCR-tube를 열음에 재빨리 냉각시켜 renaturation을 방지한 후 *Taq* DNA polymerase를 2 unit을 첨가하여 3분간 pre-denaturation을 실행하였다. 반응이 끝난 PCR product는 50 µl 중 10 µl를 사용해 6X loading buffer를 더한 다음 2% Sigma (3:1) agarose gel에서 전기영동하여 PCR product의 크기를 확인하였다. 전기영동은 100 mA agarose gel에 ethidium bromide (10 mg/ml) 5 µl를 염색하였고 UV transilluminator에서 밴드를 확인한 후 폴라로이드 필름 (667)으로 사진을 찍었다.

### 4. DNA purification

DNA를 정제하는 방법은 QIAEX II 젤 추출 kit (Qiagen)를 이용하였고 전반적인 과정은 kit의 설명서에 따라 실시하였다. Agarose 젤 상에서 얻어진 DNA 밴드는 사무용 칼을 이용해 조각 내어 얻었다. 이 DNA 밴드의 무게를 측정하여 250 mg 내의 범위에서 젤 무게의 3배가 되는 QIAEX I을 넣었다. 여기에 QIAEX II suspension을 10 µl 첨가하고 50°C heat block에서 20분간 배양시켰다. 이때 2분 간격으로 vortex

를 실시하였다. 이를 원심분리하여 (12,000 rpm/3 min) bead 와 결합된 DNA를 침전시키고, 얻어진 침전물에 500 µl QIAEX I을 넣어 원심분리하고 pellet에 500 µl PE buffer를 넣어 washing을 반복하여 수행하였다. 최종적으로 얻어진 침전물은 공기 건조하여 일정량의 dH<sub>2</sub>O를 넣어 실온에서 배양시켜 elution하였다.

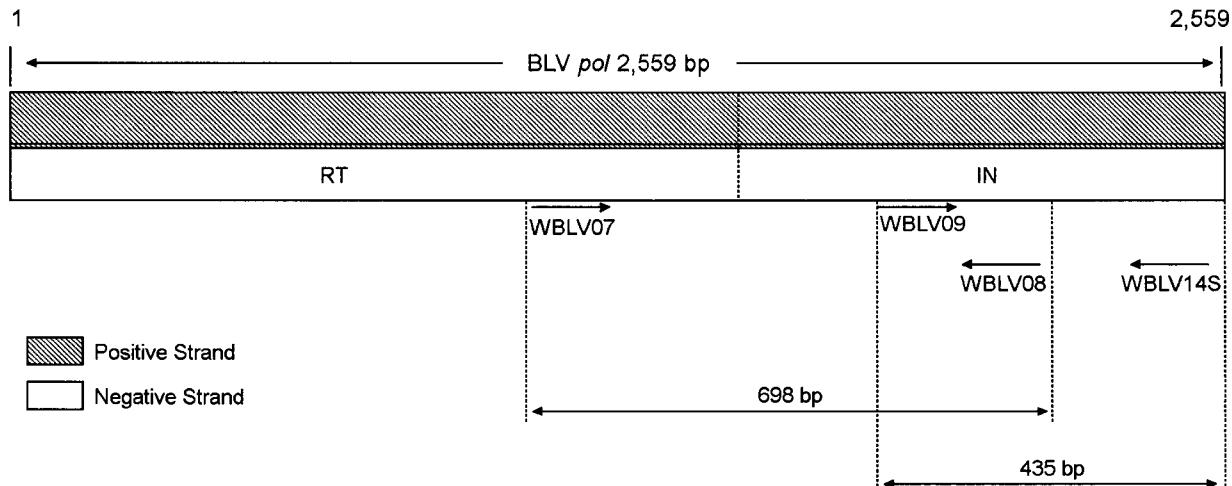
### 5. DNA sequencing

Automatic sequencer의 사용을 위한 labelling reaction은 thermal cycle 반응을 이용하였다. 먼저 reaction pre-mix에 template DNA, dH<sub>2</sub>O, Big dye, buffer, primer (PCR 반응과 동일한 primer, 4 pmol/µl)를 넣어 denaturation을 94°C/10초, annealing

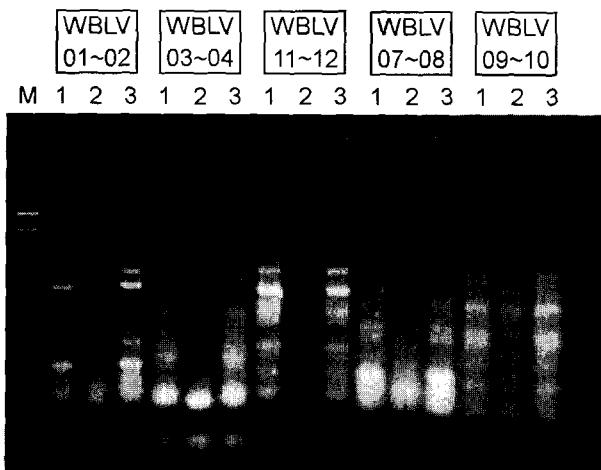
을 50°C/5초, extension을 60°C/4분으로 25회 반복하였으며 pre-denaturation을 96°C/30초에서 추가로 처리하였다. 이 방법은 unincorporated된 dye-dNTP/ddNTP를 제거하는 방법으로 sequencing ladder DNA만 모아 전기영동에 사용하였다. 먼저, Sephadex G-50 (DNA grade)을 dH<sub>2</sub>O에서 정치하였고 상온에 3시간 둔 후 15,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. Sample은 column을 사용해 DNA만 Sephadex를 통과시켜 collection tube에 모았다. Sequencing fragment는 Speed Vac으로 건조하여 dH<sub>2</sub>O로 농축하였다. 회수된 template DNA에 비이온성 계면활성제인 formamide를 첨가하였고 95°C에서 2분간 denaturation시켰다. 염기서열의 해독과정은 자동 DNA sequencer (Perkin-Elmer ABI Prism 3700 DNA analyzer)를 이

**Table 1.** List of PCR primers used in this study

Primers	Sequences	Length
WBLV01	5'- CCCGAGCCACATTGGATTTAGAAC -3'	23 mer
WBLV02	5'- CTGAAACCTTAGTCCCCGAGG -3'	22 mer
WBLV03	5'- CCCAGTCTCTCTGGTGCCTATATGG -3'	27 mer
WBLV04	5'- CTGAACTCGAGGGTCCTCAGATG -3'	23 mer
WBLV05	5'- CTTCTCTGCTGGGATGCCAATA -3'	23 mer
WBLV06	5'- GATTGCTGGATGTCGGAGGAGGC -3'	23 mer
WBLV07	5'- AGCTTGGCTTCAACCTGACCC -3'	21 mer
WBLV08	5'- GAAGGTGGGTTCTCGTCTAAGTGAT -3'	24 mer
WBLV09	5'- CCCTACAACCCCACAAGTCGG -3'	22 mer
WBLV10	5'- AGCATCTCCAAGTCTGGATGGGC -3'	23 mer
WBLV11	5'- ACCCCCTTGACTGACAACC -3'	19 mer
WBLV12	5'- CATGACCAACAACGATTCG -3'	19 mer
WBLV14S	5'- TTACCCATCTGATGATCGG -3'	19 mer



**Fig. 1.** Map of the BLV *pol* gene and the site of PCR for sequencing of Korean-type BLV integrase region. The diagram was made on a basis of the complete BLV nucleotide sequences reported by Sagata *et al.* (15).



**Fig. 2.** Preliminary PCR results with various primers for Korean-type BLV *pol* gene detection. The used primers were WBLV 01~02, WBLV 03~04, WBLV 07~08, WBLV 09~10, WBLV 11~12. Lane M represents DNA size marker ( $\Phi$ X174 *Hae*III digested). Lane 1 represents the PCR product using BLV 10C3 DNA sample. Lane 2 represents the PCR product using BLV 10C5 DNA sample. Lane 3 represents the PCR product using FLK-BLV DNA as a positive control.

용해 실시하였다.

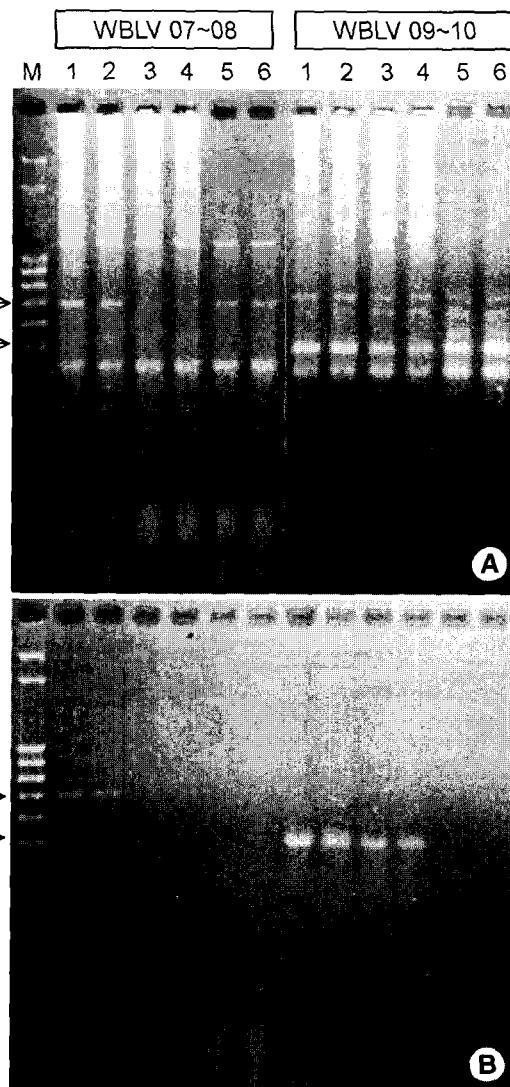
### 결과 및 고찰

#### 1. 한국형 BLV의 *pol* gene 검출을 위한 PCR 최적화

Primer의 염기서열은 BLV *pol* gene 전체영역 (2,559 bp, Fig. 1)을 대상으로 DNA 분석 프로그램인 OMINA 2.0 (Oxford Molecular, UK)을 이용하여 결정하였다. 이로부터 얻어진 primers들은 Table 1에 나타난 바와 같다. BLV가 감염된 PBMC의 DNA를 PCR할 때 사용된 각각의 primer와 얻어진 벤드의 크기는 WBLV 01~02 (벤드 크기 618 bp), WBLV 03~04 (716 bp), WBLV 05~06 (555 bp), WBLV 07~08 (698 bp), WBLV 09~10 (529 bp) 등이며, 이 중 WBLV 05~06은 WBLV 11~12 (607 bp)로 대체하였다. 또한 실험이 진행되는 중 primer WBLV 10은 WBLV 14S로 대체하였는데 primer WBLV 09와 조합하여 사용할 시 만들어지는 PCR DNA 벤드의 크기는 435 bp가 되었다 (Fig. 1).

본 연구에서 사용된 한국형 BLV는 감염된 젖소 PBMC sample 10C3의 BLV provirus (이하 BLV 10C3)로서, IN 영역을 포함하는 BLV *pol* gene은 이 PBMC의 chromosomal DNA에 존재한다. 따라서 한국형 BLV *pol* gene의 존재여부는 상기한 primer set을 사용한 PCR로 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

한편 한국형 BLV *pol* gene의 3' 영역에 존재하며 전체 *pol* gene의 3분의 1의 크기를 점유하는 IN 유전자를 PCR로 검출하였다 (Fig. 3). 이를 위해 사용한 PCR primers는 WBLV



**Fig. 3.** PCR results for Korean-type BLV integrase gene by applying primers WBLV 07~08 and WBLV 09~10. The band size of the target DNA were 698 bp and 529 bp, respectively (A). Reamplification results of the PCR DNA showed a single DNA band (B). Lane descriptions: M represents DNA size marker ( $\Phi$ X-174 *Hae*III digested). Lanes 1~6 represent BLV 10C2, BLV 10C3, BLV 10C5, BLV 10C6, BLV 10C7 and BLV 10C8, respectively.

07~08과 WBLV 09~10으로, 이들이 만들어 내는 DNA 벤드의 크기는 각각 698 bp 및 529 bp이며 BLV *pol* gene 내의 IN 영역을 충분히 커버하고 있다. Fig. 3A는 여러 가지 PBMC chromosomal DNA (10C2, 10C3, 10C5, 10C6, 10C7, 10C8)를 이용하여 이들 primers를 사용했을 때 얻어지는 PCR 결과이다. 여기서 얻어진 2개의 DNA 단편을 절단해 QIAEX II 젤 추출 kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 정제한 후 다시 같은 primers를 사용해 PCR을 한 결과, Fig. 3B에서 보는 것처럼 BLV IN 유전자의 염기서열을 포함하고 있는 2가지의 뚜렷한

5' -	CATCCAGCAA	TCTTTGTTGG	TCATGTCCGG	AGCCACTCTT
	CAGCATCCC A	CCCTATTGCT	TCCCTGAACA	ATTATGTAGA
	TCAACTGCTT	CCCTTAGAAA	CTCCAGAGCA	ATGGCATAAG
	CTCACCCACT	GCAACCCTCG	GGCCTTGTCT	CGATGGCCGA
	ACCCACGTAT	CTCTGCCTGG	GACCCCCGTT	CCCCCGCTAC
	GCTGTGTGAA	ACCTGTCAAA	AGCTCAATCC	AACTGGAGGA
	GGAAAGATGC	GAACTATTCA	AAGAGGGTGG	GCCCCGAATC
	ATATTGGCA	GGCCGATATA	ACCCATTATA	AATACAAACA
	GTTCACCTAC	GCTCTGCATG	TGTTTGTAGA	TACTTACTCT
	GGAGCTACTC	ATGCCTCGGC	GAAGCGTGGG	CTCACCACTC
	AAATGACCAT	TGAGGGCCTT	CTTGAGGCCA	TAGTGCATT
	GGGACGTCCA	AAAAAGCTAA	ACACTGACCA	AGGTGCAAAC
	TACACCTCCA	AAACCTTTGT	CAGGTTTGC	CAGCAGTTCG
	GAGTTCCCT	TTCTCATCAT	GTTCCCTTAC	ACCCACAAAG
	TTCGGGGTTA	GTAGAACGGA	CAAATGGACT	GCTCAAAC TT
	CTTCTATCTA	AATATCACCT	AGACGAACCC	CACCTTCCCA
	TGACTCAGGC	CCTTTCTCGA	GCCCTTTGGA	CTCACAACTCA
	GATTAACCTC	CTACCAAATC	TAAAGACCAG	ATGGGAGTTA
	CACCATTAC	CCCCACTTGC	TGTCATTTCA	GAGGGCGGAG
	AAACACCCAA	GGGCTCTGAT	AAACTGTTGT	TGTACAAGCT
	TCCCAGGCAA	AACAATCGTC	GGTGGCTAGG	ACCACTCCCG
	GCCCTAGTCG	AAGCCTCGGG	AGGCCCTCTC	CTGGCTACTG
	ACCCCCCGT	GTGGGTTCCC	TGGCGTTGC	TGAAGGCCTT
	CAAGTGCCTA	AAAAACGACG	GTCCCGAAGA	CGCCCCGAAC
	CGATCATCAG	A T G G G T A A	-3'	

**Fig. 4.** DNA sequences of BLV 10C3 integrase region (3' side of the BLV *pol* gene). The first codon for BLV integrase should be located in the region of the boxed area.

단일 DNA 밴드를 얻을 수 있었다. 이 DNA 밴드를 BLV IN 유전자의 염기서열을 결정하는데 사용할 수 있었다.

## 2. 한국형 BLV integrase 유전자의 DNA 염기서열 결정

BLV의 IN은 Gag-Pol polyprotein (pr145)으로부터 retroviral protease의 가수분해작용으로 절단되어 나오기 때문에 실제로 이의 DNA 염기서열은 *pol* gene의 3' 영역에 존재한다<sup>2,6)</sup>. 따라서 우리는 BLV 10C3 *pol* gene의 3' 영역의 염기서열을 결정하여 IN 유전자에 해당하는 부분의 염기서열을 결정하였다. 즉, primer WBLV 07~08을 이용하여 698 bp 크기의 DNA를 얻을 수 있었으며 primer WBLV 09~10을 이용하여 529 bp 크기의 DNA를 얻을 수 있었다. 이를 DNA를 각

각 sequencing 하였으며 IN 유전자라고 추정되는 978 bp의 염기서열을 결정할 수 있었다. 이 때 한국형 BLV 10C3 IN의 C-terminal 부분의 염기서열은 TAA (=UAA)라는 stop codon을 발견함으로써 정확히 결정할 수 있었으나, 한국형 BLV IN의 N-terminal의 시작 부분은 정확히 결정하기가 어려웠다. 왜냐하면 BLV IN의 생성은 BLV 복제시 *pol* 유전자가 polyprotein 형태로 번역된 후 만들어지기 때문에, 일반적으로 단백질을 코딩하는 유전자의 시작이 ATG (start codon)로 시작되지 않기 때문이다. 그 결과는 Fig. 4에 정리되어 있는 바와 같다.

현재까지 BLV IN region이 정확히 결정되어 있지 않기<sup>2)</sup> 때문에 HIV의 IN이 288 AA (864 bp)로 이루어지고 있음을<sup>6)</sup>

점을 착안해 이 크기를 완전히 covering할 수 있는 곳까지 염기서열을 결정하였다. 즉 우리는 BLV *pol* gene의 3' region (IN gene을 포함하는) 978 bp에 해당하는 염기서열을 확인하

였으며, Fig. 4에 제시된 DNA 염기서열의 5'부분(즉 IN 유전자의 3' end인 TAA에서 864 bp~978 bp 상류인 +1에서 +114 사이, Fig. 4의 box 부분임)에 IN 유전자의 시작점이 존

AUS	AA	H i s P r o A l a I l e P h e V a l G l y H i s V a l A r g S e r H i s S e r S e r A l a
BLV	NS	C A T C C A G C A A T C T T G T T G G T C A T G T T C G G A G C C A C T C T T C A G C A
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	S e r H i s P h e I l e A l a S e r L e u A s n A s n T y r V a l A s p G l u L e u L e u
BLV	NS	T C C C A C C C T A T T G C T T C C C T G A A C A A T T A T G T A G A T C A A C T G C T T
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	P h e L e u G l u T h r P h e G l u G l n T r p H i s L y s L e u T h r H i s C y s A s n
BLV	NS	C C C T T A G A A A C T C C A G A G C A A T G G C A T A A G C T C A C C C A C T G C A A C
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	S e r A r g A l a L e u S e r A r g T r p P r o A s n P r o A r g I l e S e r A l a T r p
BLV	NS	T C T C G G G G C C T T G T C T C G A T G G C C G A A C C C A C G T A T T T C T G C C T G G
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	A s p P r o A r g S e r P r o A l a T h r L e u C y s G l u T h r C y s G l n A r g L e u
BLV	NS	G A T C C C C G T T C C C C G C T A C G C T G T G A A A C C T G T C A A A G G C T C
BLV	NS	· · C ·
10C3	AA	
AUS	AA	A s n P r o T h r G l y G l y G l y L y s M e t A r g T h r I l e G l n A r g G l y T r p
BLV	NS	A A C C C A A C T G G A G G G C G G A A A G A T G C G G G A C T A T T C A G A G A G G G T G G
BLV	NS	· · T ·
10C3	AA	
AUS	AA	A l a P r o A s n G l u I l e T r p G l n A l a A s p I l e T h r H i s T y r L y s T y r
BLV	NS	G C C C C A A A T C A T A T C T G G C A G G G C C G A T A T A A C T C A T T A T A A A T A C
BLV	NS	· · · · · G ·
10C3	AA	
AUS	AA	L y s G l n P h e T h r T y r A l a L e u H i s V a l P h e V a l A s p T h r T y r S e r
BLV	NS	A A A C A G T T C A C C T A C G C T T T G C A C G T G T T T G T A G A T A C T T A C T C T
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	G l y A l a T h r H i s A l a S e r A l a L y s A r g G l y L e u T h r T h r G l n T h r
BLV	NS	G G A G C T A C T C A T G C C T C A G C A A A G C G A G G G G C T C A C C A C T C A A A A C G
BLV	NS	· ·
10C3	AA	M e t
AUS	AA	T h r I l e G l u G l y L e u L e u G l n A l a I l e V a l H i s L e u G l y A r g P r o
BLV	NS	A C C A T T G A G G G C T T C T T G A G G G C C A T A G T G C A T C T A G G T C G T C C A
BLV	NS	· ·
10C3	AA	
AUS	AA	L y s L y s L e u A s n T h r A s p G l n G l y A l a A s n T y r T h r S e r L y s T h r
BLV	NS	A A A A A G C T A A A C A C C G A C C C A A G G T G C T A A C T A C A C C T C C A A A A C C
BLV	NS	· ·
10C3	AA	

**Fig. 5.**

**Fig. 5.** Comparison of BLV integrase DNA sequences between Korean-type BLV (denoted as BLV 10C3) and Australian BLV (denoted as AUS BLV). The first 4 boxes (double lines) is the location of "HHCC" motif in the BLV integrase amino terminus. The next 4 boxes (single lines) is the location of DD35E motif found in the region of carboxyl terminus of BLV integrase. Among them, a thin lined box represents putative D in DD35E motif. The integrase sequences of the Australian BLV was according to Coulston *et al.* (3) published as an Australian BLV isolate.

재할 수 있다고 추정하였다. 특히 이 부위에 retroviral protease의 기질 절단 아미노산<sup>12)</sup>인 소수성 아미노산 (Phe, Tyr, Trp)과 글루타민 (Gln) 혹은 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg)들이 많이 분포해있는 점을 착안해 본다면 +1 bp에서 +114 bp 사이에서 IN 유전자의 염기서열이 시작될 것이라고 사료되었다.

### 3. 한국형 BLV integrase 유전자 염기서열과 호주형 BLV integrase 유전자 염기서열의 비교

한국형 BLV IN 유전자의 염기서열 특성과 이의 아미노산 서열을 알아보기 위하여 결정된 염기서열 수 (978 bp)에 해당되는 DNA 염기서열 및 이의 아미노산 서열을 호주형 BLV *pol gene* (Coulston *et al.*, 1990)과 비교하였다 (Fig. 5). 그 결과 한국형 BLV IN 유전자에서는 점돌연변이를 포함한 총 36개의 염기가 치환되어,  $36 \div 978 \times 100 = 3.7\%$  돌연변이율을 보여주었다. 즉, 한국형 BLV 10C3의 IN 유전자와 호주형 BLV IN 유전자의 염기서열은 96.3%의 높은 상동성을 보여주었다. 이러한 수치는 박 등<sup>12)</sup>에 의해 보고된 여러 종의 한국형 BLV의 *pol gene* 돌연변이율인 2.01%~4.02% (평균 2.9%)와 매우 근접함을 보여주었다.

또한 몇 개의 점돌연변이는 결과적으로 6개의 아미노산을 치환시켰기 때문에 한국형 BLV 10C3의 IN은 호주형 BLV IN과 비교해 볼 때 총 6개의 아미노산 서열이 달라져 있었다. 즉, 호주형 BLV IN에서 발견되는 Arg (AGG) → Lys (AAG), Thr (ACG) → Met (ATG), Ile (ATT) → Val (GTT), Asn (ACC) → His (CAC), Phe (TTT) → Leu (TTG) 및 Asn (ACC) → Asp (GAC)로 한국형 BLV IN 유전자에서는 바뀌어 있었음을 확인할 수 있었다. 이들의 변화를 좀 더 조사해 보면 Arg → Lys는 염기성 AA가 염기성 AA로 그리고 Ile → Val로의 변화는 같은 비극성 지방족 AA로의 변화이기 때문에 폴리펩티드 자체에 큰 변화를 주지는 않았다. 하지만 Thr → Met는 극성 AA가 비극성 지방족 AA로의 변화이며, Asn → His는 극성 AA가 염기성 AA로, Asn → Asp은 극성 AA가 산성 AA로 변화되었으며 Phe → Leu의 경우 방향족 AA가 비극성 지방족 AA로 바뀌게 된 것이다. 즉 이러한 결과는 한국형 BLV가 호주형 BLV와 같은 BLV이지만 돌연변이 결과로 우리나라의 고유의 BLV로 정착된 것으로 사료되었다.

### 4. 한국형 BLV integrase의 HHCC motif와 DD35E의 결정

결정된 염기서열을 아미노산 서열로 변환시켜 보았을 때, 한국형 BLV IN에서도 모든 retroviral IN에서 보존되어 있는 불변부 아미노산들인 아미노 말단부위의 zinc-finger-like "HHCC" motif가 발견되었다 (Fig. 5, 이중 box). 이는 모든 retroviruses와 transposon 및 원핵세포 transposable elements에

강하게 보존되어 있는 motif로 IN의 활성에 필수적인 요소이다<sup>6,7)</sup>. 만일 이 motif에 돌연변이가 일어나면 통합기전이 불가능하여 바이러스의 *in vivo* 복제가 일어나지 않는다<sup>13)</sup>. 이번에 조사된 한국형 BLV IN의 HHCC motif에서는 히스티딘과 히스티딘의 사이에 3개의 아미노산이 존재하며 시스테인과 시스테인인 사이에는 2개의 아미노산이 존재하고 있었다. 그리고 히스티딘과 시스테인의 거리는 25개의 아미노산으로 떨어져 있었다. 이것은 호주형 BLV의 IN에서도 마찬 가지였는데, 이로서 우리는 BLV IN의 HHCC motif가 H-X<sub>3</sub>-H-X<sub>25</sub>-C-X<sub>2</sub>-C임을 확인할 수 있었다. 일반적으로 히스티딘과 시스테인의 거리는 23~32 AA인 것으로<sup>2,5)</sup> 알려져 있는데 한국형 BLV 및 호주형 BLV에서는 25 AA임을 알 수 있었다.

또한 IN과 transposases의 보편적 motif인 "DD35E"가 발견되었다 (Fig. 5에 표시된 solid box들). IN 촉매 활성부위<sup>8)</sup>의 핵심적인 아미노산 (DDE)들은 인산전이 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있는데<sup>4)</sup>, 한국형 BLV의 IN에서의 DD35E domain은 D-X<sub>56</sub>-D-X<sub>35</sub>-E로 나타났다. 하지만 BLV 경우 Asp가 D2의 상류부 39번쨰 AA 위치에 또 존재하기 때문에 BLV integrase의 DD35E domain은 D-X<sub>38</sub>-D-X<sub>35</sub>-E일 수도 있다고 사료되었다. 하지만 일반적인 IN의 DD35E domain의 구성은 D-X<sub>(39~58)</sub>-D-X<sub>35</sub>-E이기<sup>4,14)</sup> 때문에 이에 대한 조사는 추후 계속되어져야 할 것이다. 이상을 종합해 보면 이번에 조사된 한국형 BLV IN의 염기서열은 호주형 BLV IN 염기서열과 96.3%의 homology를 보이면서 어느 정도의 차이를 나타내고 있었으나 IN의 효소활성에 절대적인 필수요소들 (HHCC motif 및 DD35E)은 두 가지의 BLV (한국형 및 호주형) 모두에서 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 2000년도 계명대학교 비사 연구기금으로 이루어졌음.

#### 참 고 문 헌

- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van Den Broeke A, Willems L and Thomas R (1988): Bovine leukemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med*, **32(1)**: 149-170.
- Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (1997): Retroviruses, pp. 161-203. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Coulston JC, Naif H, Brandon R, Kumar S, Khan S, Daniel RCW and Lavin MF (1990): Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukemia

- virus DNA: Comparison with other isolates. *J Gen Virol*, **71(8)**: 1737-1746.
- 4) Engelman A and Craigie R (1992): Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function *in vitro*. *J Virol*, **66(11)**: 6361-6369.
  - 5) Jonsson CB and Roth MJ (1993): Role of the His-Cys finger of Moloney leukemia virus integrase protein in integration and disintegration. *J Virol*, **67(9)**: 5562-5571.
  - 6) Katz RA and Skalka AM (1994): The retroviral enzymes. *Ann Rev Biochem*, **63**: 133-173.
  - 7) Khan E, Mack JPG, Katz RA, Kulkosky JL and Skalka AM (1991): Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res*, **19(4)**: 851-860.
  - 8) Kim DJ, Oh YT, Lee YK and Shin CG (1999): Analysis of integration activity of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *Mol Cells*, **9(1)**: 446-451.
  - 9) Kwon OS (1999): Molecular detection of Korean-type bovine immunodeficiency virus by polymerase chain reaction. *Korean J Biomed Lab Sci*, **5(1)**: 101-177.
  - 10) Kwon OS (2000): Identification of *pol* gene mutation among BLV proviruses found in the Southern province of Korea. *J Korean Soc Virology*, **30(2)**: 131-139.
  - 11) Kwon OS and Yoo M (1998): Molecular detection and an epidemiological study of bovine leukemia virus (BLV) among cows in the Daegu/Kyungpook area. *J Inst Nat Sci*, **17(1)**: 67-74.
  - 12) Park HJ, Yoon KP and Kwon OS (2001): A study on the *pol* gene mutation rates of bovine leukemia virus BLV-10C. *J Inst Nat Sci*, **20(2)**: 69-76.
  - 13) Roth MJ, Schwartzberg P, Tanese N and Goff SP (1990): Analysis of mutations in the integration function of Moloney murine leukemia virus: Effects on DNA binding and cutting. *J Virol*, **64(10)**: 4709-4717.
  - 14) Rowland SJ and Dyke KG (1990): Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **4(6)**: 961-975.
  - 15) Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y and Ikawa Y (1985): Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82(3)**: 677-681.
  - 16) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. pp 9.14-9.22, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
  - 17) Sherman MP, Erlich GD, Ferrer JF, Sninsky JJ, Zandomeni R, Dock NL and Poiesz B (1992): Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **30(1)**: 185-191.
  - 18) Theilen GH and Madewell BR (1987): Veterinary cancer medicine, pp. 407-429. 2nd Ed., Lea and Febiger Press, Philadelphia.
  - 19) Varmus H and Brown P (1989): Retroviruses. pp. 53-108. In Berg DE and Howe MM (eds.), "Mobile DNA", 2nd Ed., ASM Press, Washington DC.