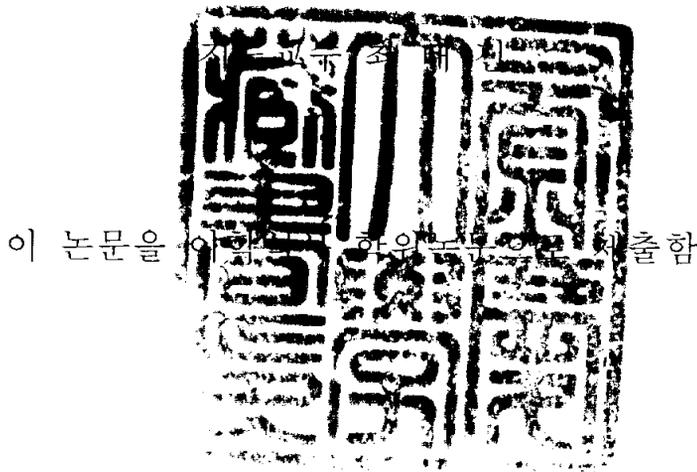


이 학 석 사 학 위 논 문

Chlorella 바이러스 PBCV-1의
A140/145R 단백질의
분자생물학적 특성



2004년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

미 생 물 학 과

이 선 미

이선미의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

주 심 농학박사 이 원 재



위 원 이학박사 이 명 숙



위 원 이학박사 최 태 진



목 차

Abstract	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
Algae와 Virus의 배양	4
Virus 순수분리	4
Viral Genomic DNA의 분리	5
A140/145R의 클로닝	5
PCR product의 ligation과 <i>E.coli</i> transformation	9
재조합 단백질의 생산	11
재조합 단백질의 정제	11
Plaque inhibition assay with recombinant protein	12
Antibody 생산	13
Western blot	13
Plaque inhibition assay with antibody	14
Protease treatment	15
PBCV-1에 감염된 NC64A로부터 mRNA의 분리	16
Northern blot	16
A140/145R 단백질의 검출	17
III. 결과 및 고찰	19
A140/145R 유전자 클로닝	19

재조합 A140/145R의 생산과 순수분리	25
재조합 단백질에 대한 항체 생산 및 Western blot	28
재조합 단백질의 Plaque inhibition assay	30
140NT와 145CT의 항체를 이용한 plaque inhibitiion assay	32
Ghost cell과 protease 처리가 바이러스 감염에 미치는 영향	33
A140/145R mRNA와 단백질 발현	35
IV. 요약	38
V. 감사의 글	40
VI. 참고문헌	41

Molecular characteristics of the A140/145R protein of chlorella virus PBCV-1

Sun-Mi Lee

Department of Microbiology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Paramecium bursaria chlorella virus type 1 (PBCV 1) is large, genetically complex, dsDNA viruses that infect certain unicellular, endosymbiotic chlorella like algae (Van Etten and Meints, 1999). To initiate infection PBCV 1 attaches to an unknown receptor on the surface of chlorella NC64A cell wall. The virus attaches to the cell wall, digests the wall at the attachment point, and releases viral DNA into the host leaving an empty capsid on the cell surface. The micrographs of PBCV-1 attaching to the chlorella cell wall by hairlike fibers suggest that the tips of these hairlike fibers are responsible for the initial recognition attachment of the virus to the host receptor. Using monoclonal antibodies that inhibit virus attachment to its host two putative PBCV-1 attachment proteins, A140/145R and A189/192R, are identified.

In this study, viral genomic DNA was isolated from purified PBCV-1. After each of N terminus and C-terminus of A140/145R ORF was amplified by PCR and cloned, 140NT and 145CT clones were transformed into *E. coli* BL21(DE3) SI strain. 140NT and 145CT proteins were overexpressed and polyclonal antibodies against these proteins were produced in mouse. When purified 140NT and 145CT proteins were added to chlorella and each or both antibodies were added to PBCV-1, there were no obvious plaque inhibition activities. however, in case of protease treatment to virus-ghost cell mixture, plaque formation was considerably decreased. These results suggested that during interaction between viral attachment protein and receptor on the surface of chlorella, attachment protein was exposed outside virus particle. To investigate expression level of A140/145R gene with change of time, northern blot and western blot were carried out. Results from northern and western blot analysis explained that A140/145R protein was a structural protein as a late protein produced in late phase of PBCV-1 infection. The results observed in this work suggest that the A140/145R could be involved in virus attachment, and the reaped middle region is important in the attachment process.

I. 서론

최근 들어 해양생물에 대한 관심이 고조되면서 이들 생물에 기생하는 바이러스에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 이러한 바이러스의 대표적인 것으로는 어류에 질병을 일으키는 바이러스가 있다. 그러나 최근에는 해양 생태계에서 중요한 생산자로 작용하는 식물성 플랑크톤을 포함한 조류에 기생하는 바이러스에 대한 연구가 미국을 비롯한 선진국에서 활발히 이루어지고 있으며 현재 44종 이상의 미세조류로부터 바이러스가 보고되어 있다(Van Etten *et al.* 2002). 이들의 연구에 의하면 해수 1ml당 $10^3 \sim 10^5$ 개의 바이러스 입자가 존재하며 이들이 해양 생태계의 생산자인 Cyanobacteria 및 식물성 플랑크톤의 생산에 많은 영향을 주고 있는 것으로 밝혀져 있다(Ortmann *et al.* 2002; Short *et al.* 2002). 또한 조류에 기생하는 일부 바이러스의 경우 *Chrysochromulina*를 비롯한 여러 적조 원인균을 사멸시키는 것으로 알려지면서 이들 바이러스에 대한 연구에 많은 노력을 기울이고 있으며 특히 바이러스는 기주 특이성이 있기 때문에 이러한 특징을 이용하여 적조를 방제하려는 연구가 일본을 비롯한 여러 나라에서 수행되고 있다(Nagasaki *et al.* 1999; Tarutani *et al.* 2000).

대표적인 미세조류 바이러스로는 짙신벌레에 공생하는 것으로 알려진 Chlorella류에 기생하는 *Paramecium bursaria* chlorella virus type 1 (PBCV-1)이다. PBCV-1은 Phycodnaviridae family의 Chlorovirus genus에 속하는 바이러스로 330,744의 염기로 구성되어 있는 dsDNA genome에 약 700여 개의 open reading frame을 포함하고 있으며, 이 중 약 375개 정도가 실제 단백질을 만드는 유전자인 것으로 추측되고 있다(Kutish *et al.* 1996; Li *et al.* 1997; Lu *et al.* 1996).

PBCV-1는 크기가 165~190nm 정도 되며 그 표면은 5040개의 capsid protein(Vp54)로 싸여 있고 그 안에는 2 중 지질막이 있는 것으로 확인되었다(Nandhagopal *et al.* 2002; Yan *et al.* 2000). 바이러스 입자에는 capsid protein외에 약 50여 종의 viral protein이 존재하는 것으로 추측되나 이들의 정확한 위치와 기능에 대하여는 아직 알려진 바가 거의 없다.

바이러스의 감염의 첫 단계는 바이러스가 기주체의 표면에 부착하는 것인데 이 과정은 바이러스의 표면에 존재하는 단백질과 기주체 표면에 존재하는 수용체(receptor)와의 상호 작용에 의하여 이루어진다. 현재까지 PBCV-1의 침입과정에 관여하는 수용체나 바이러스의 단백질에 관한 보고는 없으나 초기의 바이러스 감염과정에 관한 전자 현미경 사진에 의하면 바이러스와 기주 세포 사이를 연결하여 주는 물질이 존재하는 것으로 여겨진다.

또한 순수 분리한 바이러스에 대한 단클론 항체 중 바이러스의 감염을 억제하지만 바이러스의 capsid protein에 반응하지 않는 단클론 항체들이 분리되었는데 이들 단클론 항체들은 크기가 120~150kDa에 달하는 두 개의 바이러스 단백질에 반응하는 것으로 확인되었다(Van Etten *et al.*, unpublished data). 이 두 종류의 단백질을 분리하고 trypsin으로 절단한 후 그 조각을 mass spectroscopy 분석한 결과 이 두 단백질은 PBCV-1의 A140/145R과 A189/192R으로 판명되었다.

본 연구에서는 기존의 연구 결과에 의하여 바이러스의 부착 단백질로 추정되는 A140/145R 단백질의 유전자를 클로닝 하여 재조합 단백질과 이에 대한 항체를 생산하여 이 단백질이 실제 바이러스의 수용체 부착 단백질로 작용하는지 조사하였다.

II. 재료 및 방법

Algae 와 virus의 배양

Chlorella 바이러스인 *Paramecium bursaria* Chlorella Viurs type 1 (PBCV-1)과 그 기주인 Chlorella strain NC64A는 미국 네브라스카대 식물병리학과 James Van Etten교수로부터 분양받아 사용하였다. PBCV-1과 Chlorella strain NC64A의 배양은 변형된 Bold's basal 배지 (MBBM; modified Bold's basal medium)에서 Van Etten *et al.* (1983)에서 언급한 방법대로 이루어졌다.

Virus 순수분리

잘 자란 NC64A 배양액 100ml에 PBCV-1을 접종한 후 배양액이 완전히 lysis될 때까지 두었다. PBCV-1에 의해 완전히 lysis된 배양액은 Sorvall GS-3 rotor를 이용하여 4℃, 5,000rpm에서 5분동안 원심분리하여 상층액에 Triton-X100을 최종 농도 0.1%로 첨가하고 4℃에서 20분간 섞어주었다. 바이러스 입자는 Sorvall T-880 rotor를 이용하여 20,000rpm에서 60분동안 원심분리하여 pellet으로 모여졌다. Pellet을 50mM Tris-HCl, pH8.0에 재현탁한 후 10~40%의 비연속적 sucrose gradient (20,000rpm, 20분, 4℃)를 통해 원심분리하였다. 30~40% 사이에서 바이러스 밴드를 분리하여 T-880 rotor로 27,000rpm에서 3시간동안 원심분리하여 바이러스 pellet을 수집하였다. 수집된 바이러스 pellet은 50mM Tris-HCl, pH7.8에 재현탁 시켰다.

Viral Genomic DNA의 분리

분리된 바이러스($400\mu\ell$)는 10X TEN (100mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM EDTA, 1M NaCl) buffer ($60\mu\ell$), 1% Na-sarcosyl ($60\mu\ell$), 60% (w/w) CsCl (0.6ml) 그리고 극소량의 EtBr과 섞고 75°C 에서 15분동안 가열한 후 40~60% (w/w) CsCl gradient (Sorvall TH-641 rotor, 3,500rpm, 18시간, 25°C)를 통해 원심분리되었다. DNA 밴드를 수집하고 butanol extraction에 의해 EtBr을 제거하였다. DNA를 EtOH로 침전시키고 건조한 후 1X TE (10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA) buffer에 재현탁시켰다.

A140/145R의 클로닝

A140/145R 원래 인접한 두 개의 유전자에 의하여 만들어지는 두 개의 단백질로 알려졌으나 염기서열을 재확인한 결과 하나의 유전자에 의하여 만들어지는 분자량 135kDa의 단백질로 확인되었다. 이 단백질은 중앙부위에 6개의 NANK motif가 반복되어 있어 클로닝 과정에 recombination에 의한 internal deletion이 일어나기 때문에 A140/145R의 N-terminus와 C-terminus를 분리하여 PCR을 이용하여 클로닝 하였다. N-terminus는 140NFTOPO primer와 140NRTOPO primer를 이용하여 PCR하였으며 C-terminus는 140CFTOPO primer와 140RBTOPO primer를 이용하여 PCR 하였다. PCR 반응은 순수 분리된 PBCV-1 genomic DNA ($0.5\mu\text{g}$)를 template로 하여 ExTaq polymerase (Takara, Japan)를 이용하여 수행하였으며, 반응 조건은 94°C 에서 5분간 반응시

킨 후 94℃ 1분 30초, 57℃ 1분, 72℃ 2분을 40 cycles를 반복하고, 다시 72℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 생성물은 1%(w/v) agarose gel에서 전기 영동한 후 EtBR 염색을 하여 UV를 이용하여 조사하였다.

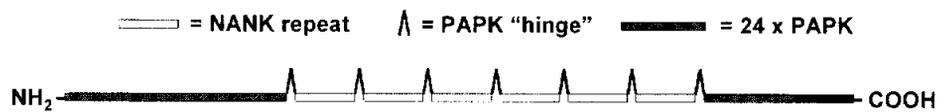


Figure 1. Structure of A140/145R protein. There are 6 NANK motifs flanked by 24 PAPK motif, which causes intramolecular recombination during cloning of this gene.

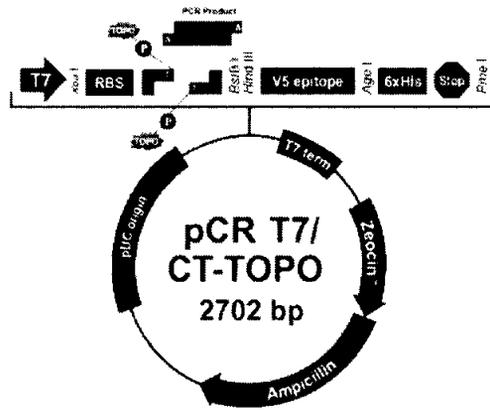
Table 1. Primers used for cloning of A140/145R

Primer	Sequence
140NFTOPO	5' ATGTCATCTGAAGAAACTGCTCGT-3'
140NRTOPO	5' GCAGACAGTAGGACATTTACCAC-3'
140CFTOPO	5'-GGTAACAGACCGTCTGCAAATAC-3'
140RBTOPO	5'-GCACAGGGACGGACATTATAC-3'

PCR product의 ligation 과 *E.coli* transformation

PCR 생성물은 대장균에서 재조합 단백질을 생산하게 위하여 expression vector에 클로닝하였다. N-terminus 부분은 C-terminus 부분에 histidine tag가 결합하도록 되어 있는 pCR T7/CT-TOPO vector (Invitrogen, San Diego, CA)에 클로닝하였으며 C-terminus 부분은 N-terminus 부분에 histidine tag를 가지는 pCRT7/NT-TOPO vector에 클로닝 하였다(Figure 2). PCR product (3 μ l)와 vector 1 μ l (100ng)를 두 시간 동안 ligation 시킨 후 *E. coli* TOP10 strain에 transformation 하였다. Ampicillin이 첨가된 배지에서 자란 colony로부터 DNA를 분리하여 BamH I과 EcoR I으로 절단하여 원하는 PCR 산물이 클로닝되었는지를 확인한 후 최종적으로 염기서열을 분석하여 원하는 클론을 확보하였다. 클로닝된 유전자로부터 재조합 단백질을 생산하기 위하여 확보된 클론으로부터 DNA를 분리하고 이를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3) SI strain을 transformation하였다. 이들 *E. coli*로부터 얻어진 재조합 단백질을 각각 140NT와 140CT로 명명하였다.

A



B

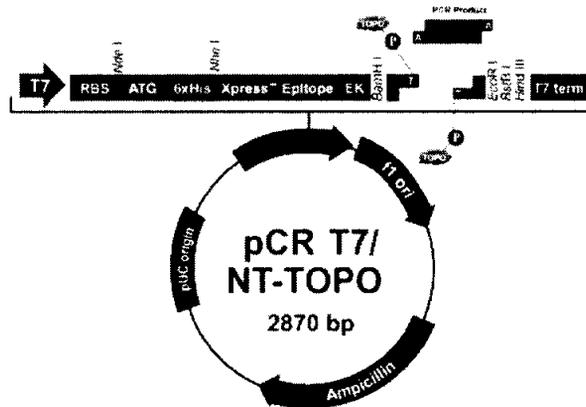


Figure 2. Cloning vector used for the cloning of A140/145R N-terminus and C-terminus. The N-terminus and C-terminus were cloned into the pCR T7/CT-TOPO vector (A) and the pCR T7/NT-TOPO vector (B) for C-terminal and N-terminal tagging, respectively.

제조합 단백질의 생산

형질전환 된 *E. coli*로부터의 제조합 단백질의 생성을 조사하기 위하여 ampicillin($50\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 LBON배지 3ml에 single colony를 접종하여 $\text{OD}_{600}=0.5$ 가 될 때까지 배양한 후 3M NaCl $300\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 25°C 에서 2시간, 4시간, 6시간 배양하였다. 배양된 세포들을 원심분리하여 모으고 pellet을 sample loading buffer [1mM EDTA, 250mM Tris-Cl (pH6.8), 4% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.2% bromophenyl blue, 50% Glycerol]에 녹이고 100°C 에서 5분간 끓인 다음 얼음에서 냉각시켰다. 식힌 sample을 4~20% gradient SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하고 gel을 Coomassie brilliant blue로 염색하여 단백질의 발현을 조사하였다. 발현된 단백질이 soluble한 형태인지를 알아보기 위하여 40ml의 LBON (LB without NaCl) medium을 4ml의 overnight culture로 접종하고 25°C 에서 2시간 배양한 후 3M NaCl을 첨가하여 최종농도가 0.3M되도록 하였다. 이들 세포를 같은 조건에서 5시간 더 배양한 후 $4000\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 세포들을 모았다. 침전된 세포를 $400\mu\text{l}$ 의 lysis buffer (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0)로 재현탁한 후 sonication (50% amplitude, 5초 pulse, 3×1.5 분 sonication)에 의하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 $10,000\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후 위와 같은 방법으로 SDS-PAGE를 실시하였다.

제조합 단백질의 정제

제조합 단백질을 순수분리하기 위하여 ampicillin ($100\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 400

mℓ의 LBON 배지에 20mℓ의 0/N culture를 접종하고 25℃에서 16시간 배양한 후 최종농도가 0.3M이 되도록 NaCl을 첨가하였다. 이들 세포는 2시간 동안 더 배양한 후 4000×g 에서 5분간 원심분리하여 세포를 모았다. 침전된 세포는 2mℓ의 lysis buffer로 재현탁하고 위에서 설명한 방법으로 sonication에 의하여 파쇄한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. 상등액 20mℓ에 28μℓ β-mercaptoethanol과 10% Triton X-100 2mℓ, 그리고 1mℓ의 Ni-NTA resin (Qiagen, USA)을 첨가한 후 4℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. 단백질이 결합된 Ni-NTA resin을 mini column에 loading하고 상등액이 모두 제거된 후 resin column을 1%의 Triton X-100가 첨가된 washing buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH8.0) 5mℓ로 2회 세척한 후 Triton X-100이 포함되지 않은 washing buffer 5mℓ로 1회 세척하였다. Resin에 결합된 단백질은 최종적으로 1mℓ의 elution buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0)로 3회 elution 한 후 Bradford assay kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하고 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다.

Plaque inhibition assay with recombinant protein

재조합 140NT와 145CT의 사전 처리에 의하여 PBCV-1에 의한 *Chlorella* NC64A의 감염억제 여부를 plaque assay를 통하여 확인하였다. *Chlorella* cell을 5000×g에서 5분간 원심분리하여 농축된 세포를 MBBM에 현탁하여 4×10⁸cell/mℓ로 조정하였다. 농축된 세포 300μℓ와 20μg의 순수 분리된 단백질을 혼합하여 저속 rotator를 이용하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 여기에 약 200pfu의 바이러스 50μℓ를 첨가한 후 다시 30분간 반응시키고 NC64A에 부착하지 않은 바이

러스를 제거하기 위하여 5,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 침전물을 300 μ l의 MBBM으로 재현탁하고 3ml의 top agar와 섞어 MBBM plate에 plating한 후 25℃에서 배양하면서 plaque의 형성을 조사하였다. 실험은 3반복으로 수행한 후 그 평균값으로 처리간의 차이를 비교하였다.

Antibody 생산

순수 분리된 재조합 140NT와 145CT 단백질에 대한 polyclonal antibody는 다음과 같은 방법에 따라 만들어졌다. 정제된 단백질 25 μ g을 PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH7.4)로 전체 부피 50 μ l로 맞추고 Freund's complete adjuvant (Sigma) 50 μ l와 혼합하여, 생후 6주된 BALB/C 쥐에 1차 주사하였다. 1주일 후에는 단백질과 Freund's incomplete adjuvant를 1:1 비율로 혼합하고 1주일 간격으로 5 μ l씩 2, 3, 4차 주사하였다. 4차 주사 1주일 후에 PBS로 희석한 sarcoma cell (1×10^7 cell)을 복강에 주사하고 1~2주 후에 복수를 추출하였다. 추출된 복수는 3,000×g로 15분간 원심분리한 후 상등액을 -20℃에서 보관하였다.

Western blot

생산된 항체가 원래의 항원에 특이적으로 반응하는지와 순수 분리된 바이러스로부터 이 항체에 반응하는 바이러스 단백질이 있는지를 확인하기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. 순수 분리된 바이러스(2.2×10^9 pfu)와 1 μ g의 순수 분리된 단백질을 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동 하였다. 분리

된 단백질을 transfer buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 20% methanol)에서 250mA로 약 1시간 30분간 nitrocellulose (NC) membrane으로 electrotransfer하였다. NC membrane을 TTBS [0.8% NaCl, 0.2% KCl, 20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.05% Tween-20]에 5분간 씻고 blocking buffer(5% skim, TTBS)에 넣어 30분 흔들어 주어 blocking 하였다. Blocking 후, 140NT와 145CT protein에 대한 polyclonal antibody (1: 3,000)를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. Primary antibody 반응 후, TTBS로 5분간 3회 씻고 blocking buffer를 넣고 30분간 blocking 한 후 alkaline phosphatase가 결합된 anti-mouse IgG(1: 30,000)를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. NC membrane을 TBS로 씻고 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, 0.15mg/ml) 33 μ l와 NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride, 0.3mg/ml) 43 μ l가 든 10ml의 alkaline phosphatase buffer [0.1M Tris-HCl (pH9.5), 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂]로 옮겨 발색반응을 일으켰다.

Plaque Inhibition assay with antibody

140NT와 145CT에 대한 항체의 바이러스 사전처리에 의한 감염억제 여부를 plaque assay를 통하여 확인하였다. Chlorella cell을 5000 \times g에서 5분간 원심분리하여 농축된 세포를 MBBM에 현탁하여 4 $\times 10^8$ cell/ml로 조정하였다. 항체는 50mM Tris-HCl (pH7.8)를 이용하여 1: 250으로 희석하였다. 100 μ l의 바이러스 (1.2 $\times 10^9$ pfu/ml)와 희석된 바이러스 100 μ l를 혼합하여 한 시간 동안 상온에서 저속 rotator를 이용하여 반응시킨 후 4000 \times g에서 4분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 50mM Tris-HCl (pH7.8)에 10¹~10⁵까지 희석한 후 희석

된 바이러스 50 μ l, 300 μ l NC64A, 그리고 3 ml의 top agar를 섞어서 MBBM plate에 plating한 후 25 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 plaque의 형성을 조사하였다. 실험은 3반복으로 수행한 후 그 평균값으로 처리간의 차이를 비교하였다.

Protease treatment

A140/145R이 바이러스의 attachment로 작용하지만 기주체에 접촉하기 전에는 바이러스 표면에 노출되어 있지 않고 기주세포와의 접촉에 의하여 표면으로 유도되는지를 ghost cell (methanol extraction된 NC64A)과 protease 처리를 이용하여 확인하였다. 사용한 protease는 Proteinase K (25mg/ml), Trypsin (10 mg/ml), Protease E (100mg/ml), 그리고 Protease IV (100mg/ml)이다. Protease의 바이러스 자체에 대한 영향을 알아보기 위하여 바이러스 300 μ l (2×10^{10} pfu/ml)를 240 μ l의 50mM Tris-HCl (pH7.8)와 혼합한 후 90 μ l씩 분주하고 여기에 10 μ l의 protease 또는 50mM Tris-HCl (pH7.8)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 까지 희석하고 위에서 설명한 방법에 의하여 plaque assay를 수행하였다. 또한 처리한 바이러스는 4~20% gradient SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하고, 위에서 설명한 방법으로 Western blot을 실시하였다. Ghost에 바이러스를 먼저 반응시키는 경우에는 바이러스 300 μ l (2×10^{10} pfu/ml)를 240 μ l의 ghost (2.6×10^9 cells/ml)와 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C에서 30분간 저속 rotator를 이용하여 반응시켰다. 바이러스와 ghost 혼합액을 90 μ l씩 분주한 후 위와 같이 protease 또는 50mM Tris-HCl (pH7.8)로 처리하여 plaque assay를 수행하였다.

PBCV-1에 감염된 NC64A로부터 mRNA의 분리

MBBM에서 배양한 NC64A *Chlorella*를 4000×g에서 5분간 원심분리한 후 MBBM에 재현탁하여 2×10^9 cells로 조정하였다. 이 *Chlorella* cell을 250ml 플라스크에 40ml씩 분주한 후 45~60분 동안 형광등 조명에서 shaking하면서 배양하였다. 각각의 flask에 moi (multiplicity of infection)가 5가 되도록 바이러스를 접종하고 위와 같이 배양하였다. 접종 후 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360분 후에 mRNA를 분리하였다. 감염된 세포를 4000×g에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 침전물을 liquid N₂에서 급속 동결시키고 -80℃에서 보관하였다. 동결된 세포에 소량의 0.3mm glass beads를 첨가한 후 mortar와 pestle을 이용하여 마쇄하고 2ml screw-cap microfuge tube에 옮긴 후 750μl의 TRI reagent (Promega, USA)를 첨가하였다. 혼합액을 상온에서 5분간 반응시킨 후 150μl의 chloroform을 첨가하고 15초간 vortex한 후 다시 상온에서 5~15분간 정치하였다. 혼합액을 microfuge를 이용하여 4℃에서 15분간 최대속도로 원심분리하였다. 상등액을 새 tube로 옮기고 상등액 부피의 1/2에 해당하는 isopropanol을 첨가하고 상온에서 5~10분간 정치하였다. Microfuge를 이용하여 4℃에서 10분간 원심분리하고 침전물을 70% 에탄올을 이용하여 세척한 후 5~10분간 상온에서 건조하였다. 건조된 mRNA는 DEPC를 처리한 증류수에 재현탁하고 정량한 후 사용하였다.

Northern blot

위에서 분리한 mRNA 4μg을 6.0% formaldehyde를 함유한 1X

HEPES/EDTA buffer로 만든 1.5% agarose gel에서 100V로 4시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 0.1M NH₄Ac, 0.5μg/ml ethidium bromide 용액에서 30~45분간 염색한 4°C에서 증류수로 destaining하고 UV 조명하에서 RNA band를 확인하였다. Agarose gel로부터 RNA를 20X SSC를 이용하여 capillary 방법에 의하여 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 UV cross linker를 이용하여 고정하였다. Probe 제작을 위하여 pCR T7/CT-TOPO vector에 클론된 140NT 부분 insert를 Hind III와 Xba I으로 잘라내어 agarose gel에서 전기영동 후 해당 DNA 조각을 gel에서 분리하였다. 분리된 DNA를 template로 Klenow fragment와 32P-dCTP를 이용한 random priming 방법에 의하여 probe를 제작하였다. Nitrocellulose membrane은 prehybridization 용액 (5X SSC, 5X Denhardt's solution, 20mM Na(H)PO₄, pH6.5, 250μg/ml ss salmon DNA, 50% formamide)을 이용하여 65°C에서 1시간 동안 prehybridization 시켰다. Prehybridization 용액을 제거한 후 여기에 25ml의 hybridization 용액 (5X SSC, 1X Denhardt's solution, 20mM Na(H)PO₄, pH6.5, 100μg/ml ss salmon DNA, 50% Formamide)를 넣은 후 첨가하고 여기에 5분간 끓인 후 얼음에서 급냉시킨 probe를 첨가하였다. Hybridization에서 65°C로 overnight 동안 hybridization 시킨 후 2X SSC, 0.1% SDS로 10분간 1회 상온에서 세척, 65°C에서 10분간 2회 세척 후 다시 0.1X SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 15분간 세척한 후 -80°C에서 X-ray film에 노출하였다.

A140/145R 단백질의 검출

PBCV-1에 감염된 NC64A 세포로부터 A140/145R 단백질을 확인하기 위

하여 세포에 바이러스를 접종한 후 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 250, 360분 후에 total protein을 추출하였다. 추출된 단백질을 50 μ g/sample로 4~20% gradient SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 위에서 설명한 방법으로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮기고 1:3000으로 희석된 140NT에 대한 항체를 이용하여 A140/145R 단백질을 검출하였다.

순수 분리된 바이러스에서의 A140/145R 단백질이 soluble 한 fraction에 존재하는지를 알아보기 위하여 순수 분리된 바이러스를 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리한 후 10,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 나누었다. 이들 sample을 sample loading buffer에서 끓인 후 4~20% gradient SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하고 140NT에 대한 항체를 이용하여 위에서와 같은 방법으로 Western blot을 실시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

A140/145R 유전자 클로닝

PBCV-1의 A140/145R 유전자의 ORF는 genomic DNA의 5' 말단으로부터 73121-76511에 위치하는 3390개의 염기로 구성되어 있으며 염기서열과 그로부터 유추된 아미노산 서열은 Figure 3에 제시되어 있다. A140/145R는 1130개의 아미노산으로 되어 있으며 추정 분자량은 135kDa이다. A140/145R는 Figure 1에서 보는 바와 같이 PAPK hinge로 분리되어 있는 6개의 NANK motif가 중앙에 위치하며 24개의 PAPK motif가 C-terminus에 위치한다. 중앙에 위치하는 반복 염기서열은 클로닝 과정에서 intramolecular recombination을 유도하기 때문에 본 연구에서는 A140/145R ORF를 N-terminus와 C-terminus의 두 개 부분으로 나누어 클로닝하였다. Table 1에 표시된 두 쌍의 primer로 PCR을 수행하여 N-terminus와 C-terminus에 해당하는 1263bp와 759bp의 PCR 산물을 얻었다(Figure 4). N-terminus는 421개의 아미노산을 coding하며 C-terminus는 230개의 아미노산을 coding하고 있다. PCR 산물은 각각 pCR T7/CT-TOPO와 pCR T7/NT-TOPO vector에 클로닝하고 T7 primer를 이용하여 sequencing을 수행하여 연결부위를 확인하였다.

140F TOPO primer →

ATGTCATCTGAAGAACTGCTCGTTCCATAGGTGGTCCGTTTCCCATGAAT
M S S E E T A R S I G G P F P M N

GCAACTATCAGAGACGTATTCGAAGAATCAAGGTATTCTCCTCTGGATTCT
A T I R D V F E E S R Y S P L D S

GCACCACTTCACCTTGACCAAGTGCCGCAGTTTCCGGGATCCTAATGTG
A P L H L A P S A A V S G D P N V

AAGATCTGCTTCACAGAAGCGGAATTGGCCACGAAATGCCCTAGCATCCTA
K I C F T E A E L A T K C P S I L

ATCAAGCCTAAACCCAAACCACCGGCGAGCAACGTATGCACTGGATACGAA
I K P K P K P P A S N V C T G Y E

ACCGTGGCCCCTGGTGACGGCTATGAAAAGAATTATGGTGACAATGATGAT
T V A P G D G Y E K N Y G D N D D

GGTGGGTTCCGACCTATGATTCCTGATAACAACTCGAACCATACTATTTT
G G F A P M I P D N K L E P Y Y F

GGCAACCCCCGCAACAAGTTCTCTTCCGTTGAAAGATAATAACAACAAGG
G N P P Q Q G S L P L K D N T T T

ACTCTCAAAGAAAGTAATCTAACAATCACCTATTACCTCGCGTTGCTCAA
T L K E S N L T I T L L P R V A Q

GCAATTTCAAGCATTAACTAGGAAATGTAGAGTTCCTGAATACACCCGGT
A I S S I K L G N V E F L N T P G

GAACTATGTTTCAGTTCGCTGCTACAGAGCTGCCGAAAGGGACGAGCGAT
G T M F S S A A T D V P K G T S D

AAGTTGACTCGTGTTGACGAGGCTGGGAACAAAACCCGACGAAATCAACG
K L T R V D E A G N K N P T K S T

AGCAAAGTGATGAAAGTCGCGGCGAATAAAAATAGCGGTTCACTTCAGTC
S K V M K V A A N K N S A F T S V

CAAGCATCATACTATCTCCCCCTGGAAGCGTCCCTCGGTGACAAACCGGTG
Q A S Y Y L P P G S V L G D K R V

GCTCACAAGTCTACTCTCAGTAATACAGTTATATCCAAGAGGATTTCTATT
A H K S T L S N T V I S K R I S I

GCACCTAATAAAGTTGTTAGATACACAACGGGTATATCTATGGAACACCCT
A P N K V V R Y T T G I S M E H P

Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of PBCV-1 A140/145R. The locations of the primers used for the cloning of the N-terminus and C-terminus were underlined.

TTCATCAGCTCTCGTATGAACGTTCCGAAATACAGCCTCAAACCTCAATTC
 F I S S R M N V P K Y S L K P Q F

AAGAAGATTTTGTATTATAAGAGGAGCACGAACTCTTGGGTTACACCGACG
 K K I L Y Y K R S T N S W V T P T

CAATCAAAAATCCACCTTGGTGCTGACCATCGTGCTTTCATTTTCACTACA
 Q S K I H L G A D H R A F I F T T

ACCGACCACAAAGTCGCTATGGGAGTAAGACCTATAGATTTTCTAAACCT
 T D H K V A M G V R P I D F P K P

AAAAATTTTGGTTCAAAGTCTATAAECTCGTTCGAAACCCATATCACCCGG
 K N F G S K F Y N S F E T H I T R

GGAACAAAAGCAATAAATGTCGCTAGCACTCTCGTGGTGGGAAGACGGGG
 G T K A I N V A S T L V V G R R G

GGCATGGCATCCAAATTATGGGCACCCTCTGGTACATATTCGGTGACACAA
 G M A S K L W A P S G T Y S V T Q

GACTACATTTTGGTACTTTTGCCGAAGTTCAAAAATACTTAACAACGTG
 D Y I F G T F A E V Q K I L N N V

<- 14ONRTOPO primer

TTTAAAGGCAGTAATGGTGGTAAATGTCCTACTGTCTGCCCCCGAAACCA
 F K G S N G G K C P T V C P P K P

CCATCTGGGACAAAAATAATACCCGGTAAGATAAGAAATGTCGTAACGCA
 P S G T K I I P G K I R N V V N A

AACAAGTTTGTAGTGACGTATGAGAATAACATCACCAACAGTTATGTTGGC
 N K F V V T Y E N N I T N S Y V A

ACGAGGGTTACGAAGGCTAAGCACGGATTCAAGGCTAACGAACCTGTTAAT
 T R V T K A K H G F K A N E P V N

GTTACCGTAGATGCACAGACATGGGTAGTGAAAAACGTTACCAAGAGAGGT
 V T V D A Q T W V V K N V T K R G

GCTGGTAAACCCACGGTGAAACCCACGGCACCCGTTGGAACCATCATTATC
 A G K P T V K P T A P V G T I I I

GCAGCGAAGGTGACGGCGGTACCAAATGCCAATAAAGTAAGCCTGCAGTAC
 A A K V T A V P N A N K V S L Q Y

ACCAAACCAACAAGAACTGACGAAGGTGACTGTTACCAAGACCAAACAC
 T K P N K K L T K V T V T K T K H

GGGATGAAGGTCGGAGAAGCTGTTGACGTCGTTGTACGTAACAAGGATCCG
 G M K V G E A V D V V V R N K D P

Figure 3. Continued

TATGCTTTCGTCGCGGTGTACAAGAAGGGTGTCTATTAACCCGCACCCAAA
Y A F V A V Y K K G A I K P A P K
CCTGCCGGTAAACCCACGGCACCCGCTGGAACCATCGTTATAGCCGGAAG
P A G K P T A P A G T I V I A A K
GTGACGGCGGTGCCAAATACCAACAAAGTAAGCCTTCAGTACACTAAACCG
V T A V P N T N K V S L Q Y T K P
AACAGAAGCTGACGAAGGTGACTGTTACCAAGACCAAACACGGGATGAAG
N K K L T K V T V T K T K H G M K
GTGCGCGAATGYGTTGACGTCGTTGTACGTAACAAGGATCCGTATGCATTC
V G E X V D V V V R N K D P Y A F
GTAGCGGTGTACAAAAAGGGTGTCTATTAACCCGCTCCCAAACCCGCTCCC
V A V Y K K G A I K P A P K P A P
AAACCCGGTCCCAAACCCGCACCAGCAGGAACCATCGTAATCTCCGCGAAA
K P G P K P A P A G T I V I S A K
GTAAGTCCGTTCCGAACGCTAACAAAGTAAGCCTGCAATACACTAAACCG
V T A V P N A N K V S L Q Y T K P
AACAGAAGCTGACGAAGGTGACYGTTTRCCAAGACCAAACACGGGATGAAG
N K K L T K V T V X K T K H G M K
GTCGGYGAAGCTGTTGACGTCGTYGYRCGKAACAAGGATCCTTATGCATTC
V G E A V D V V X R N K D P Y A F
GTAGCAGTGTACAAAAAGGGTGTCTATTAACSCGCGCCTAAAMSCGCACCA
V A V Y K K G A I K X A P K X A P
AAGCCTACAAATACCATCAAAATTAACGCAAAGTAAGTCTGTTCCGAAT
K P T N T I K I N A K V T A V P N
GCCAACAAGGTAAGCATTCAATACAAAAACCCGACAAAAAGATCGCAAAA
A N K V S I Q Y T K P D K K I A K
CTCACAGTCAACAAACCAAAACACGGAATGAAGAAAGGGGAAACTGTGATC
L T V N K P K H G M K K G E T V I
GTTGTACATACATAAAAAGGCTCCCTATAAATTTGTATCTGTGAACAAAAG
V V I H K K A P Y K F V S V N K K
AACGCTCCTAAACCCGCGCAAAGCCTACAAATACCATCAAAATTAACGCA
N A P K P A P K P T N T I K I N A
AAAGTAAGTCTGTTCCGAACGCCAACAAGGTAAGCATTCAATACAAAA
K V T A V P N A N K V S I Q Y T K
CCCGACAAAAAGATCGCAAAACTCACAGTCAACAAACCAAAACACGGAATG
P D K K I A K L T V N K P K H G M

Figure 3. Continued

AAGAAAGGAGAACTGTGATCGTTGTCATACATAAAAAGGCTCCCTATAAA
 K K G E T V I V V I H K K A P Y K
 TTTGTATCCGTGAACAAAAAGAACGCTCCTAAACCCGCACCTAAACCAGGT
 F V S V N K K N A P K P A P K P G
 140CFT0PO ->
 AACAGACCGTCTGCAAATACAAATTGGTCAAAAGTACAATCCGAATACAAT
 N R P S A N T N W S K V Q S E Y N
 GCATTGATAAACTCTAAAAATCACATGCGGTGGCTATAATAACACTCCAA
 A L I N S K K S H A V A I I T L Q
 AAGAAATGGCAGGATATAGGACCTGCAAATGAAGCAAGACTGAAAAAGGA
 K K W Q D I G P A N E A R L K K G
 TATAAACCCGGAGGCAAACCTGCACCGAAACCTACAGACCCATCAGAATT
 Y K P G G K P A P K P T D T I R I
 AACACAAAAGTAATGGGAGTACCAAGTGCTGATAAGATTTCTTTGCAATAC
 N T K V M G V P S A D K I S L Q Y
 GTTAAACCTGATAAAAAGATCGCAAAACTCACAGTCAACAAACCAAAACAC
 V K P D K K I A K L T V N K P K H
 GGAATGAAGAAAGGGAAACTGTGATCGTTGTTATACGTAAAAAGGCTCCC
 G M K K G E T V I V V I R K K A P
 TATAAATTTGTATCCGTGAACAAAAAGAACGCCCTAAACCCGCTCCCAAA
 Y K F V S V N K K N A P K P A P K
 CCCGCTCCCAAACCTGCACCCAAACCCGCTCCTAAACCCGCTCCTAAACCC
 P A P K P A P K P A P K P A P K P
 GCACCCAAACCTGCACCCAAACCCGCTCCTAAACTTGCTCCTAAACCCGCT
 A P K P A P K P A P K L A P K P A
 CCTAAGCCCGCACCGAAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCCGCACCC
 P K P A P K P A P K P A P K P A P
 AAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAA
 K P A P K P A P K P A P K P A P K
 CCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCCGCACCCAAACCC
 P A P K P A P K P A P K P A P K P
 GCACCTAAACCCGCACCTAAAAATAATGAAAGATTCGTAATAATTATAAAA
 A P K P A P K K *
 AATAAGCATTTTGTGTTGTATAATGTCCGTCCTGTGCAAGAATTCA
 <- 140RBTOPO primer

Figure 3. Continued

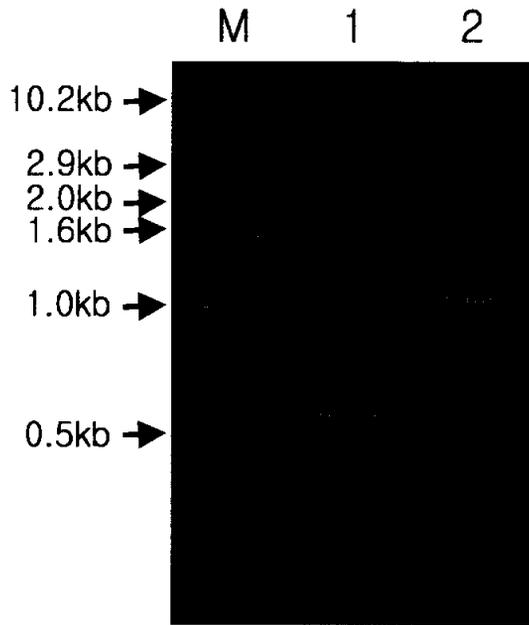


Figure 4. PCR amplification of the N-terminus and C-terminus of the PBCV-1 A140/145R gene. Lane M: DNA size maker; 1, C-terminal PCR product; 2, N-terminal PCR product.

재조합 A140/145R의 생산과 순수분리

E. coli BL21(DE3) SI strain을 A140/145R의 N-terminus와 C-terminus를 포함한 클론으로 형질전환 한 후 0.3M NaCl을 이용하여 단백질의 발현을 유도하였다. SDS-PAGE를 이용한 전기영동 후 Coomassie brilliant blue로 염색한 결과 예상 크기의 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 단백질은 NaCl을 첨가하지 않은 세포에서도 일부 발현이 되었으나 NaCl을 첨가한 배지에서 보다 많은 단백질이 발현되었다(Figure 5). 발현된 단백질들을 각각 재조합 140NT와 145CT로 명명하고 이들 단백질을 순수분리하기 위하여 *E. coli*를 대량 배양한 후 파쇄하고 상등액에 녹아있는 재조합 단백질을 Ni-NTA column을 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질을 SDS-PAGE 전기영동을 통하여 조사한 결과 대부분의 단백질이 첫 번째와 두 번째 elution과정에 회수되었다(Figure 6). 1~3차까지 elution한 단백질은 Centricon (Amicon, USA)을 이용하여 농축한 후 Bradford assay를 통하여 정량하고 1X PBS를 이용하여 최종 농도가 1mg/ml이 되도록 조절하였다.

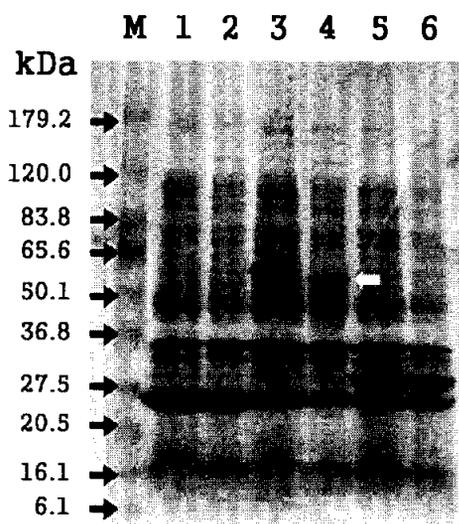


Figure 5. Expression recombinant 140NT protein and 145CT protein from NaCl induced *E. coli* cells. Lane M, pre-stained protein size maker; 1, non-induced control; 2, induced control; 3, non-induced 140NT; 4, induced 140NT; 5, non-induced 145CT; 6, induced 145CT.

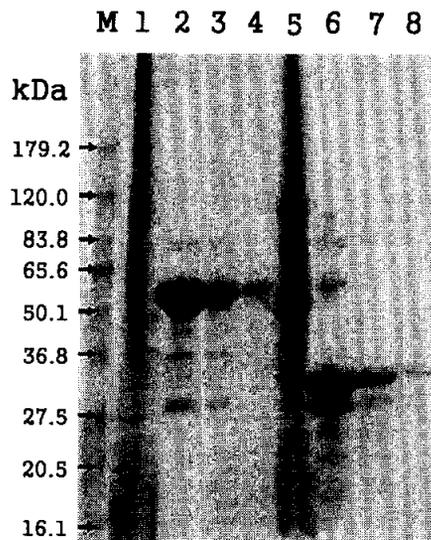


Figure 6. Purification recombinant 140NT and 145CT protein expressed from *E. coli*. Lane M, pre-stained protein size marker; 1, total cell lysate from 140NT; 2, first eluate of 140NT; 3, second eluate of 140NT; 4, third eluate of 140NT; 5, total cell lysate of 145CT; 6, first eluate of 145CT; 7, second eluate of 145CT; 8, third eluate of 145CT.

재조합 단백질에 대한 항체 생산 및 Western Blot

순수 분리된 재조합 140NT와 145CT 단백질을 쥐에 조사하여 이들 단백질에 대한 polyclonal antibody를 생산하였다. 이들 항체를 이용하여 순수 분리된 바이러스와 항원으로 이용한 단백질에 대한 Western blot을 실시한 결과 두 항체는 원래 사용한 항원에만 특이적으로 반응하고 서로 간에 교차 반응을 하지 않는 것으로 확인되어 두 단백질 모두에 존재하는 6개의 histidine tag는 epitope로 작용하지 않았거나, 이 부분을 인식하는 항체의 비율이 매우 적은 것으로 확인되었다. 또한 두 종류의 항체 모두 순수 분리된 바이러스로부터 분자량 140kDa의 동일한 단백질에만 특이적으로 반응하였다(Figure 7).

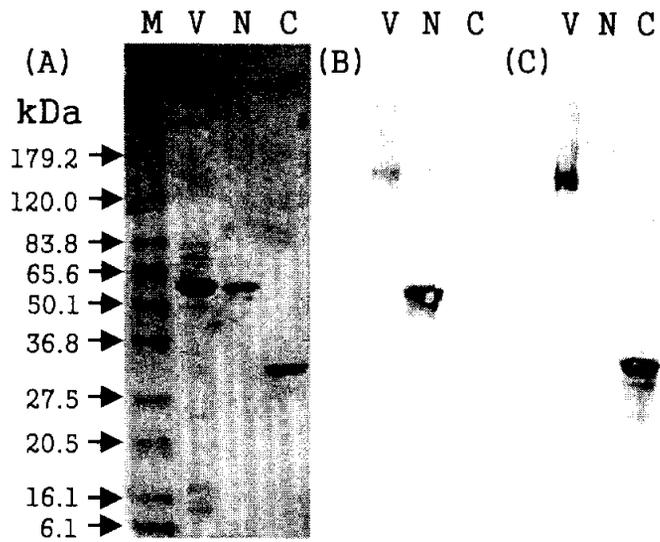


Figure 7. Western blot analysis of PBCV-1 with antibodies against recombinant 140NT and 145CT proteins. Purified virus and recombinant protein was detected with Coomassie brilliant blue staining (A), western blot with antibody against 140NT (B) and 145CT (C). Lane M, pre-stained protein size marker; V, purified PBCV-1; N, purified 140NT protein; C, purified 145CT protein.

재조합 단백질의 Plaque inhibition assay

재조합 140NT와 145CT 단백질을 바이러스 접종 전에 기주체에 처리하였을 경우 기주체 표면에 존재하는 바이러스 수용체에 이 단백질들이 결합하여 이후의 바이러스 감염을 억제하는지를 plaque inhibition assay를 통하여 조사하였다. 재조합 단백질을 처리하지 않은 부처리의 경우 plaque수는 평균 89.7개로 나타났으며 145CT 단백질을 처리한 경우에는 89.3개 140NT와 145CT를 모두 처리한 경우에는 72.3개로 나타나 부처리구와 145CT를 처리한 경우에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 140NT를 처리한 경우에는 처리 직후 Figure 8에서 보이는 바와 같이 NC64A의 응집현상이 일어나고 이러한 클로렐라를 plating 했을 때 chlorella cell에 의한 lawn이 형성되지 않아 plaque inhibition 여부를 확인할 수 없었다. 이러한 응집현상은 이 단백질에 하나 이상의 결합 부위가 존재하여 세포의 결집현상을 유도한다고 볼 수 있다. 재조합 140NT와 145CT 단백질에 의한 이러한 plaque inhibition assay결과는 A140/145R 단백질이 부착 단백질로 작용하더라도 실제 수용체에 결합하는 부위가 N-terminus나 C-terminus가 아닌 중간 부위일 경우 나타날 수 있다.

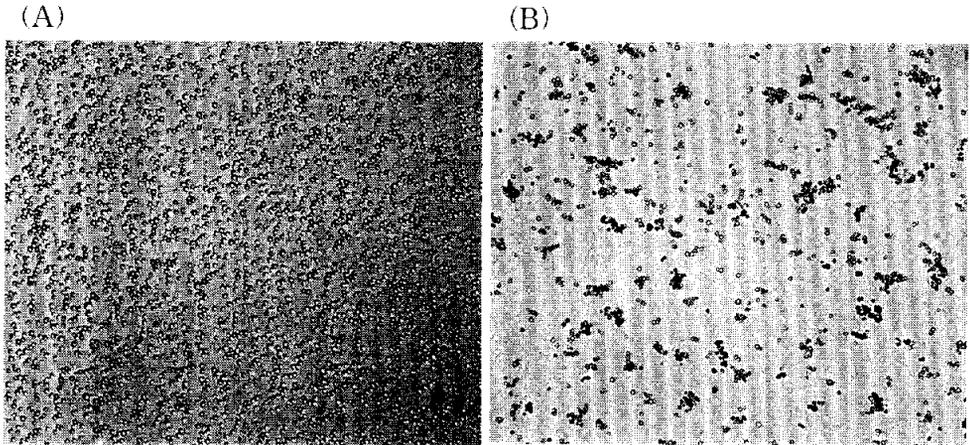


Figure 8. Aggregation of Chlorella NC64A by purified recombinant 140NT protein. Chlorella NC64A cell before (A) and after (B) addition of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified 140NT recombinant protein.

140NT와 145CT의 항체를 이용한 plaque inhibition assay

A140/145R 단백질이 바이러스의 부착 단백질로 작용한다면 재조합 단백질 140NT와 145CT에 대한 항체는 이 바이러스에 결합함으로써 바이러스의 기주체 침입을 억제할 것으로 기대된다. 이를 확인하기 위하여 바이러스와 항체를 혼합하여 반응시킨 후 원심분리하여 항원-항체 결합물질을 제거한 후 그 상등액을 기주세포와 혼합하여 plating하였다. 그 결과 항체를 처리하지 않은 바이러스에서는 265 plaques, 140NT 항체 처리에서는 387 plaques, 145CT 항체 처리는 357 plaques, 140NT 항체와 145CT 항체를 모두 처리하였을 경우에는 335 plaques가 형성된 반면 순수분리된 PBCV-1 virion에 대한 항체를 처리하였을 때는 plaque가 전혀 형성되지 않았다. Picodnavirus의 경우 바이러스가 기주체에 부착한 다음 conformational transition이 일어나 바이러스의 항원성을 변화시키거나 protease에 대한 감수성을 증가시키는데(Fricks, Hogle 1990) 이중 swine vesicular disease virus (SVDV)의 capsid protein인 VP1의 N-terminus는 높은 항원성을 나타내는 부분으로 바이러스 입자의 내부에 위치하다가 기주체와 접촉 후 밖으로 돌출되어 감염이 이루어지도록 한다(Jimenez-Clavero *et al.* 2001, Li *et al.* 1994) 그러므로 이러한 현상은 A140/145R 단백질이 부착 단백질로 작용하더라도 바이러스 표면에 존재하는 것이 아니라 major capsid protein 사이 또는 그 아래에 존재하다 기주 세포와의 접촉에 의하여 표면으로 돌출되는 경우 나타날 수 있다.

Ghost cell과 Protease 처리가 바이러스 감염에 미치는 영향

A140/145R 단백질이 바이러스의 표면에 존재하지 않으면서 바이러스의 부착단백질로 작용할 경우 이 단백질은 바이러스의 가까이 존재하고 있다가 바이러스와 기주체간의 접촉에 의하여 바이러스 표면으로 노출될 가능성이 있다. 이러한 경우, 바이러스를 먼저 죽은 기주 세포인 NC64A의 ghost cell에 반응시켜 부착단백질을 유도하고 protease를 처리하게되면 바이러스의 감염에 영향을 미칠 것으로 기대되었다. Table 2는 바이러스를 protease로 직접 처리하거나 ghost cell과 혼합하고 protease를 처리한 후 plaque assay를 실시한 결과이다. 이 결과에서 볼 수 있듯이 바이러스를 protease로 처리하였을 경우에는 처리간에 차이를 볼 수 없었다. 그러나 바이러스를 ghost cell과 반응시킨 후 plaque assay를 할 경우 처리하지 않은 바이러스에 비하여 plaque 수가 12% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이는 바이러스와 기주체간의 결합이 비가역적이며 죽은 기주세포인 ghost cell에 PBCV-1이 결합하여 그 감염력을 상실한다는 것을 보여준다. 그리고 ghost cell과 바이러스를 혼합한 후 protease로 처리할 경우 protease를 처리하지 않은 바이러스에 비하여 protenase K 처리는 13%, trypsin 처리에서는 0.06%, protease type IV 처리는 0.43% 그리고 protease E 처리에서는 0.05%에 해당하는 plaque가 형성되었다. 이러한 현상은 바이러스와 기주체의 결합에 의하여 숨겨져 있던 부착단백질이 노출된 후 효소에 의해 절단되어 결국 바이러스의 감염성이 감소된 것이다.

Table 2. Effect of protease treatment on plaque formation

Virus	Enzyme	Dilution Factor	Number of Plaques	Converted Plaque Numbers ^{a)}
Virus	No treatment	10^{-7}	64.3	64,300
	Protenase K	10^{-7}	79	79,000
	Trypsin	10^{-7}	54	54,000
	Protease IV	10^{-7}	54.7	54,700
	Protease E	10^{-7}	58	58,700
Virus + Ghost	No treatment	10^{-6}	80	8,000
	Protenase K	10^{-5}	103	1,030
	Trypsin	10^{-5}	50	500
	Protease IV	10^{-4}	34.3	34.3
	Protease E	10^{-4}	43.3	43.3

a). These number was obtained by multiplying the plaque number and reciprocal of the dilution factor.

A140/145R mRNA와 단백질 발현

PBCV-1에 감염된 세포에서의 A140/145R 유전자의 시간별 발현 추이를 조사하기 위하여 감염된 세포로부터 mRNA와 total protein을 분리하여 각각 Northern blot과 Western blot 분석을 실시하였다. Figure 9는 Northern blot 결과로서 그림에서 볼 수 있듯이 약 4kb 크기의 RNA가 감염 후 90분 이후부터 검출되어 6시간 이후까지 계속 검출되었다. Figure 10은 Western blot 결과로서 A140/145R 단백질은 감염 후 약 120분부터 검출되기 시작하여 감염 후 6시간 후까지 지속적으로 관찰되었다. 이는 A140/145R 단백질이 바이러스 감염후기에 만들어지는 late protein으로 바이러스 입자를 구성하는 구조단백질임을 보여준다.

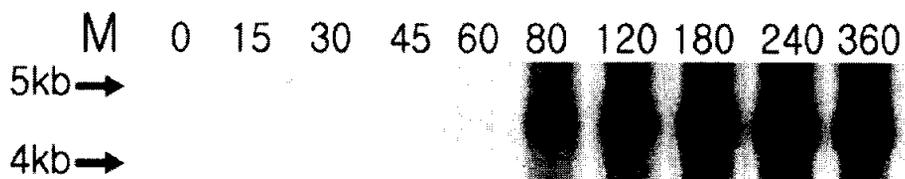


Figure 9. Northern blot analysis of A140/145R transcript from PBCV-1 infected *Chlorella* NC64A cells. Lane M, RNA size maker; rest of lanes indicate time after virus inoculation in minute.

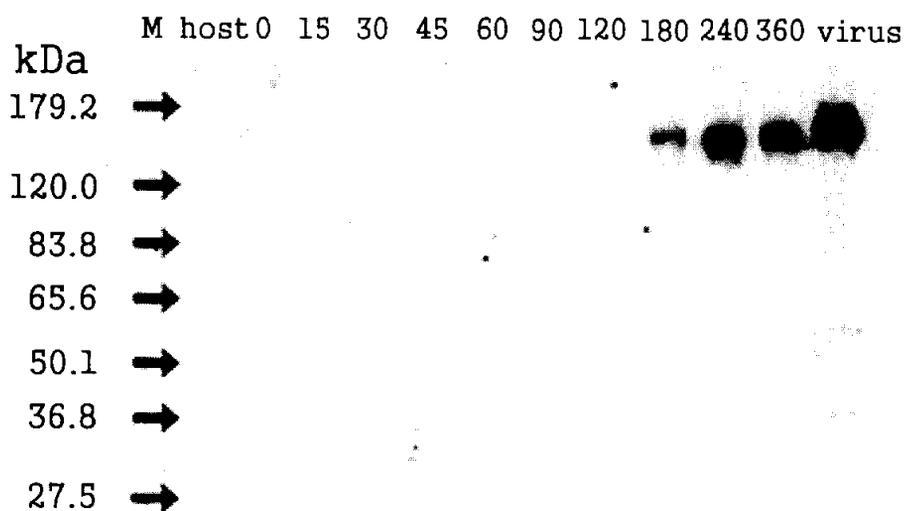


Figure 10. Western blot analysis of A140/145R transcript from PBCV-1 infected *Chlorella* NC64A cells. Lane M, pre-stained protein size maker; Host, total protein from non-infected NC64A; Virus, purified PBCV-1; rest of lanes indicate time after virus inoculation in minute. Western blot was performed with antibody against 140NT protein.

IV.요 약

대표적인 미세조류 바이러스로 쇠신벌레에 공생하는 것으로 알려진 Chlorella류에 기생하는 *Paramecium bursaria chlorella virus -1* (PBCV-1)는 Phycodnaviridae family의 Chlorovirus genus에 속하는 바이러스로 330,744의 염기로 구성되어 있는 dsDNA genome에 약 700여 개의 open reading frame을 포함하고 있으며, 이 중 약 375개 정도가 실제 단백질을 만드는 유전자인 것으로 추측되고 있다.

PBCV-1는 감염 초기에 기주세포 표면에 존재하는 수용체에 결합한 후 세포에 구멍을 만들어 바이러스의 DNA를 기주 세포 안으로 삼입시키는 것으로 알려져 있다. 현재 기주 세포에 존재하는 수용체나 여기에 부착하는 바이러스의 부착 단백질에 대하여 정확히 알려진 바가 없으나 기주체 표면의 전자 현미경 사진과 바이러스의 침입을 억제하는 단클론 항체를 이용한 연구 결과 이 바이러스의 부착 단백질로 A140/145R 단백질과 A189/192R 단백질이 바이러스의 부착 단백질로 작용하는 것으로 추측되고 있다.

본 연구에서는 순수 분리된 바이러스로부터 genomic DNA를 분리하여 이를 template로 이용하여 PCR을 수행하여 A140/145R 단백질의 N-terminus 부분의 421개의 아미노산을 코딩하고 있는 부분 (140NT)와 C-terminus는 230개의 아미노산을 코딩하고 있는 부분 (145CT)를 클로닝한 후 *E. coli* BL21(DE3) SI strain에 도입하여 단백질을 대량 발현시켰으며 이에 대한 항체를 쥐를 이용하여 합성하였다.

순수분리된 140NT와 145CT 재조합 단백질을 기주체에 처리하였을 경우와 바이러스에 이들 단백질에 대한 항체를 단독 또는 복합 처리한 경우 모두에서

뚜렷한 plaque inhibition activity를 보이지 않았다. 그러나 바이러스를 ghost cell에 부착시킨 후 protease로 처리할 경우 plaque의 수가 현저히 감소되었다. 이러한 결과로 A140/145R 단백질이 부착단백질로 존재하나 A140/145R 단백질의 말단이 아닌 가운데 부분이 실제 결합 부위이며, 바이러스가 기주세포에 접촉하는 과정에서 부착에 관여하는 단백질이 바이러스 입자내에 존재하다가 protease에 의해 분해되기 쉽게 노출되는 것으로 추정된다. 또한 A140/145R 단백질은 바이러스 감염 후기에 발현되는 바이러스 구조 단백질의 하나로 확인되었다.

V. 감사의 글

많이 부족한 제자를 부모님처럼 항상 배려하고 가르쳐 주신 최태진 교수님께 깊은 감사드립니다. 그리고 바쁘신 일정 속에서도 논문을 검토해 주신 이원재 교수님과 이명숙 교수님께도 감사드립니다. 대학원 생활 동안 많은 관심과 가르침을 주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 김영태 교수님께도 감사드립니다.

실험실 생활의 기초를 가르쳐 주고 지금까지 많은 의지가 되어준 은영언니, 현향언니, 정말 많은 도움과 가르침을 준 홍묵선배, 부족한 후배를 항상 걱정해 주고 도움을 준 종오선배, 선생님 안 계신 동안 큰 버팀목이 되어준 현화언니, 많은 것들을 챙겨주고 힘이 되어 준 지연언니 모두모두 감사합니다. 그리고 실험실 생활을 재밌게 잘 할 수 있도록 도와준 재경선배, 경규선배, 궂은 일 마다 않고 도와준 하나뿐인 동기 경우, 많이 도와주지 못했는데 실험실 생활에 힘이 되어준 혜경이, 혜진이, 공부하면서 실험실 일하느라 고생한 다영이, 호선이, 정현이 모두에게 고마운 마음을 전합니다.

대학원 생활동안 어렵고 힘들 때 함께한 윤숙이, 혜영이, 지현언니, 주연언니, 미영이, 용배선배, 재광선배, 지선이, 영주, 미주 모두 고맙고 앞날에 좋은 일이 있길 바랍니다. 그리고 부족한 후배에게 많은 조언과 도움을 주신 정민선배, 종규선배, 재형선배, 지희언니, 대성선배, 선희언니에게도 감사드립니다.

언제나 곁에서 힘이 되어준 호선이, 윤숙이, 혜영이, 동희, 성경이, 유경이 모두에게 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 이 논문을 낼 수 있기까지 항상 믿어주고 격려해주시는 할아버지, 할머니, 아버지, 어머니, 민경이, 재두 모두 고맙고 사랑합니다.

VI. 참고문헌

- DeAngelis PL, W Jing, MV Graves, DE Burbank, and JL Van Etten. (1997). Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science*. 278(5344):180~183.
- Fortune JM, OV Lavrukhin, JR Gurnon, JL Van Etten, RS Lloyd, and N Osheroff. (2001). Topoisomerase II from Chlorella virus PBCV-1 has an exceptionally high DNA cleavage activity. *J Biol Chem*. 276(26):24401~2448.
- Fricks CE, JM Hogle. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol*. 64(5):1934-45.
- Jimenez-Clavero MA, E Escribano-Romero, AJ Douglas, V Ley. (2001) The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J Virol*. 75(2):1044-7.
- Kaiser A, M Vollmert, D Tholl, MV Graves, JR Gurnon, W Xing, AD Lisee, KW Nickerson, and JL Van Etten. (1999). Chlorella virus PBCV-1 encodes a functional homospermidine synthase. *Virology*.

263(1):254 ~ 262.

Kutish GF, Y Li, Z Lu, M Furuta, DL Rock, and JL Van Etten. (1996). Analysis of 76 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 182 to 258. *Virology*. 223(2):303 ~ 317.

Landstein D, MV Graves, DE Burbank, P DeAngelis, and JL Van Etten. (1998). Chlorella virus PBCV-1 encodes functional glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase and UDP-glucose dehydrogenase enzymes. *Virology*. 250(2):388 ~ 396.

Li Q, AG Yafal, YM Lee, J Hogle, and M Chow. (1994) Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J Virol*. 68(6):3965-70.

Li Y, Z Lu, L Sun, S Ropp, GF Kutish, DL Rock, and JL Van Etten. (1997). Analysis of 74 kb of DNA located at the right end of the 330-kb chlorella virus PBCV-1 genome. *Virology*. 237(2):360 ~ 377.

Li Y, Z Lu, DE Burbank, GF Kutish, DL Rock, and JL Van Etten. (1995). Analysis of 43 kb of the Chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 45 to 88. *Virology*. 212(1):134 ~ 150.

- Lu Z, Y Li, Q Que, GF Kutishx, DL Rock, and JL Van Etten. (1996). Analysis of 94 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 88 to 182. *Virology*. 216(1):102~123.
- Lu Z, Y Li, Y Zhang, GF Kutish, DL Rock, and JL Van Etten. (1995). Analysis of 45 kb of DNA located at the left end of the chlorella virus PBCV-1 genome. *Virology*. 206(1):339~352.
- Meints RH, DE Burbank, JL Van Etten, and DT Lamport. (1988). Properties of the Chlorella receptor for the virus PBCV-1. *Virology*. 164(1):15~21.
- Morehead TA, JR Gunon, B Adams, KW Nickerson, LA Fitzgerald, and JL Van Etten. (2002). Ornithine decarboxylase encoded by chlorella virus PBCV-1. *Virology*. 301(1):165~175.
- Nagasaki K, K Tarutani, and M Yamaguchi. (1999). Growth characteristics of Heterosigma akashiwo virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl Environ Microbiol*. 65(3):898~902.
- Nandhagopal N, AA Simpson, JR Gurnon, X Yan, TS Baker, MV Graves, JL Van Etten, and MG Rossmann. (2002). The structure and evolution

- of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(23):14758~14763.
- Ortmann AC, JE Lawrence, and CA Suttle. (2002). Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp. *Microb Ecol.* 43(2):225~231.
- Short SM, and CA Suttle. (2002). Sequence analysis of marine virus communities reveals that groups of related algal viruses are widely distributed in nature. *Appl Environ Microbiol.* 68(3):1290~1296.
- Sun L, JR Gurnon, BJ Adams, MV Graves, and JL Van Etten. (2000). Characterization of a beta-1,3-glucanase encoded by chlorella virus PBCV-1. *Virology.* 276(1):27~36.
- Sun L, B Adams, JR Gurnon, Y Ye, and JL Van Etten. (1999). Characterization of two chitinase genes and one chitosanase gene encoded by Chlorella virus PBCV-1. *Virology.* 263(2):376~387.
- Tarutani K, K Nagasaki, and M Yamaguchi.(2000). Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl Environ Microbiol.* 66(11):4916~4920.

- Urban S, KM Breiner, F Fehler, U Klingmuller, H Schaller. (1998) Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J Virol.* 72(10):8089-97.
- Van Etten JL, MV Graves, DG Muller, W Boland, and N Delaroque. (2002). Phycodnaviridae-large DNA algal viruses. *Arch Virol.* 147(8):1479~516.
- Van Etten JL, and RH Meints. (1999). Giant viruses infecting algae. *Annu Rev Microbiol.* 53:447~494.
- Van Etten JL, LC Lane, and RH Meints. (1991). Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev.* 55(4):586~620.
- Yan, X.n NH Olso., JL Van Etten, M Bergoin, MG Rossmann, and TS Baker (2000). Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses. *Nat Struct Biol.* 7, 101~103.