



참돔 지느러미 유래의 PMF 세포주 (PMF)에 대한 Megalocytivirus의 연속감염 특성 분석

정민경 · 권우주 · 민준규 · 정현도†
부경대학교(학생) · *부경대학교(교수)

Characterization of Persistent Infection of Megalocytivirus in PMF Cell Line Derived from the Fin of Red Sea Bream *Pagrus major*

Min-Gyeong JEONG · Woo-Ju KWON · Joon-Gyu MIN · Hyun-Do JEONG†
Pukyong National University(student) · *Pukyong National University(professor)

Abstract

In Megalocytivirus-persistently infected PMF cells (PI-PMF), the expression level of Mx gene was increased more than 20-fold, which was maintained consistently the same level through 7 days of subculture for passage. Moreover, although typical cytopathic effects (CPEs) of viral infections were observed in most of the cultured cells, the appearance of ladder-type DNA by cleavage of chromosomal DNA showing apoptosis was not confirmed. Both of these characteristics may be necessary factors for PI-PMF cells to be a persistent state of infection. By using limiting-dilution method analyzing the production of virus in each single cell, we figured out that approximately 9.4% of the cells in PI-PMF cell population exist as uninfected cells even in supernatant containing high density of virus during culture.

Key words : Megalocytivirus, Persistent infection, PMF cell line, Limiting dilution

I. 서론

일본에서 최초로 발생하였으며(Inouye et al., 1992), 우리나라에서도 주요 양식어종 중 하나인 돌돔에 매년 발생하여 경제적인 손실을 입히는 Red sea bream iridovirus disease(RSIVD)의 원인체는 family Iridoviridae의 genus Megalocytivirus이다. RSIVD에 대한 효과적인 예방백신을 제작하기 위해서는 고농도의 바이러스의 배양이 필수적이지만(Choi, 2016), 현재 Megalocytivirus의 배양을 위해 상업적으로 분양되고 있는 세포인GF (grunt fin)와 BF(bluegill fin)-2 cell line은 고농도의

Megalocytivirus를 수득하기에 어려움이 있다(Nakajima and Sormachi, 1994). 반면, 최근 개발된 참돔 지느러미 유래 주화세포인 PMF(*Pagrus major* fin) cell line은 Megalocytivirus 접종 이후 고농도의 바이러스를 생산할 수 있고 또한, 7일에 한 번 반복적인 계대 배양을 통해, 세포의 사멸없이 바이러스에 연속적으로 감염되어 있는 persistently infected PMF (PI-PMF) cell line이 확립되었다(Jin, 2014; Yoon, 2015).

연속감염에 대한 보고는 어류를 포함한 여러 동물세포에서 보고되어 있다. 동물세포에서는 human immuno-deficiency virus(HIV)가 CD+ jurkat

† Corresponding author : 051-629-5941, jeonghd@pknu.ac.kr

* 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의해 연구되었음.

T-cell line에, sindbis virus가 rat prostatic adenocarcinoma(AT-3) cell에 persistent infection을 유도한다는 보고가 있으며(Levine and Griffin, 1993), 어류세포의 경우, barramundi brain(BB) cell line에서의 Betanodavirus의 연속감염이나 (Chi et al., 2005; Wu and Chi, 2006), epithelioma papulosum cyprini(EPC) cell line에서의 infectious pancreatic necrosis virus(IPNV)의 감염 (Kim et al., 2012) 등이 보고되고 있다.

PI-PMF는 전술한 연속 감염 세포들과는 달리 많은 수의 세포에서 둥글고 빛을 보이는 전형적인 Megalocytivirus 감염의 세포 변성효과가 관찰되며, 세포 배양 상등액에는 비연속 감염세포의 것보다 오히려 높은 수준의 바이러스 농도를 보인다(Yoon, 2015). 하지만 현재까지 이러한 연속 감염의 mechanism과 감염된 세포가 갖는 특성에 대한 연구가 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 먼저 i) PI-PMF의 세포는 바이러스의 감염에서 나타나는 증대된 면역반응을 보여 주는지, ii) Cytopathic effect(CPE) 생성에 의하여 apoptosis가 나타나는지를 DNA fragmentation 기법으로 확인하는 한편, 바이러스 연속감염 상태의 유지를 위한 세포적 dynamic stage에 대한 상황 분석을 위하여, iii) 바이러스 연속 감염 상태가 유지되고 있는 PI-PMF cell population에는 비감염 PMF 세포가 존재하는지, iv) 분리 배양된 이들 비감염 PMF 세포는 바이러스에 재 감염성을 보이는지, 분석하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 세포의 배양

세포의 배양을 위한 배지의 조성은 항생제 (penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml)와 10% FBS(Gibco)가 첨가된 L-15 배지(Leibovitz medium, Sigma-Aldrich)이며 0.2µm membrane filter를 이용해 filtering하여 사용하였고, 배양 온도는

25°C로 하였다. 세포의 계대배양을 위해서 0.5% Trypsin-EDTA를 처리한 후 4°C, 500g에서 5분간 원심 분리하여 washing하였다. 이 후 0.4% trypan blue 염색을 통해 살아있는 세포를 개수한 뒤 seeding하였다.

2. 바이러스의 배양

2000년 9월 남해안 양식장에서 분리한 Megalocytivirus sachun-1(IVS-1)을 사용하였다. 바이러스의 배양은 PMF 세포를 T25 cell culture flask(Corning)에 10⁵ cells/ml의 농도로 식균한 후 25°C에서 3일 배양 후 세포가 바닥의 80% 정도의 confluency를 이루었을 때, 바이러스를 10⁶ copies/1.5 ml/flask의 농도로 접종하였다. 접종 30분 후에 5 ml의 FBS-free medium으로 washing하고 새로운 10%의 FBS를 함유한 L-15 배지 5ml를 첨가하고 25°C에서 배양하였다.

3. 바이러스의 연속 감염

바이러스 접종 7일 후 감염된 PMF 세포는 전술한 비감염 PMF세포의 계대배양과 동일한 방법으로 계대배양을 실시하였다. 간단히 보면, 0.5% Trypsin-EDTA의 cell detachment 과정을 거치고, 0.4% trypan blue 염색법을 사용하는 계수에서 생존 세포의 비율이 97% 이상임을 확인 한 후 계대 배양을 실시하였다. 본 연구에서는 감염 후 새로운 바이러스의 접종 없이 매 7일 마다 실시하는 subculture를 15회 실시한 감염 PMF 세포를 PI-PMF의 source로 하였으며, 그 배양 상등액에 있는 바이러스를 이후의 실험에 사용하였다.

4. 세포 및 바이러스의 핵산 분리

DNA 분리는 GeneAll® Exgene™ Clinic/Cell SV mini kit (GeneAll)를 이용해 제조사의 방법에 따라 분리한 후 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다. RNA 분리는 RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)를

이용해 제조사의 방법에 따라 분리한 후 즉시 cDNA 합성에 사용되었다.

5. cDNA 합성

Microtube(0.2ml)에 reverse transcriptase 0.5 μ l, buffer 2 μ l, dNTP 2 μ l, Oligo(dT) primer 1 μ l (Promega), total RNA 1 μ g을 넣고, total volume이 10 μ l이 되게 Nuclease-free water을 첨가한 후, 42 $^{\circ}$ C; 60 min, 99 $^{\circ}$ C; 10 min 로 반응시켰다.

6. 바이러스 정량분석

Megalocytivirus의 MCP gene이 삽입된 plasmid를 stangard curve를 제작하는데 사용하였다. Plasmid DNA를 Quanti-TTMPicogreen[®] dsDNA reagent and Kits(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 농도를 측정하고 이로부터 plasmid copy를 결정한 후 10-fold로 단계 희석하여 standard curve(1.0 \times 10⁸~1.0 \times 10¹copies/ μ l)를 작성하는데 사용하였다. 이후 Viral DNA의 정량을 위한 absolute qPCR은 Jin et al.(2017)에 서술된 방법에 따라 실시하였다.

7. 유전자 발현 분석

0.2ml microtube에 TOPO realTMqPCR2 \times

PreMIX(SYBR Green with low ROX, Enzynomics) 10 μ l, 100 pmol의 각 목표 유전자에 상응하는 forward 및 reverse primer set 1 μ l (<Table 1> 참조), template cDNA 1 μ l 를 첨가한 후, distilled water로 PCR 혼합물 최종 volume이 20 μ l가 되게 하였다. Real-time PCR을 위해 Rotor-GeneTM6000 (CorbettResearch,AUS)을 사용하였으며, 조건은 95 $^{\circ}$ C; 10 min, 40 cycles (95 $^{\circ}$ C; 10s, 55 $^{\circ}$ C; 15s, 72 $^{\circ}$ C; 20s)로 하였다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72 $^{\circ}$ C부터 95 $^{\circ}$ C까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. Immune gene의 발현량은 $\Delta\Delta$ Ct법을 이용해 beta actin과 Mx gene의 비교에 따른 상대적 정량으로 비교하였다.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct value of target gene} - \text{Ct value of } \beta\text{-actin}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct of test group} - \Delta\text{Ct of control group}$$

$$\text{Gene expression} = E^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

8. PCR

Microtube (0.2ml)에 2 \times ExPrime Taq Premix (Genet Bio) 10 μ l, 각각 1 μ M의 M1F, M1R 1 μ l (<Table 1> 참조), 1 μ l의 template를 넣어준 후 DEPC water로 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였다. PCR amplification은 Applied Biosystems

<Table 1> Primer used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Amplicon (bp)	Object	Reference
qM1F	GGCGACTACCTCATTAATGT	141	Quantitation	Jin (2014)
qM1R	CCACCAGGTCGTAAATGA			
rsbMx1F	CGCTGTCAAAGGCAACTCAT	157	Immune response	
rsbMx1R	CCAGAGAGCGGAGAGAGTCA			
rsbB-actinF	GTGCCATCTACGAGGGTTA	156		
rsbB-actinR	CTCCTTAATGTCACGCACGA			
M1F	GCTGCGCATGCCAATCATCT	401	Detection (1-step)	
M1R	ATGCGATGGAGACCCACTTGG			
M2F	AATGACACCGACACCTCCTC	288	Detection (2-step)	
M2R	TGCGATGGAGACCCACTTGT			

2720 thermal cycler(ABI)를 사용하였으며, PCR 조건은 94°C; 5min, 35 cycles (94°C; 30s, 55°C; 30s, 72°C; 30s), 72°C; 7min로 하였다. 증폭된 산물을 template로 하여, M2F, M2R을 이용해 같은 방법으로 2-step PCR을 실시하였다. 증폭된 산물은 0.5 μ g/ml ethidium bromide(EtBr)가 첨가된 1% agarose gel을 완충액 0.5× TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에 넣어 전기영동을 실시하였고 UV 검출기(Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하여 분석하였다.

9. DNA fragmentation assay

세포는 0.5% Trypsin-EDTA(Gibco)를 이용해 떼어낸 뒤 두 번의 washing을 거쳐 모아진 세포의 pellet에서 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 일정한 양으로 맞추어(2 μ g/ μ l) 2% agarose gel에 50V로 80분간 전기영동하여 DNA fragmentation을 확인하였다. Positive control로써, PMF cell을 25cm² cell culture flask(Corning)에 5×10⁵ cells/5 ml/flask의 농도로 25°C에서 배양한 후 3일 뒤 배양액에 DL- Dithiothreitol (DTT, Bioshop Canada Inc.)를 2mM의 농도가 되도록 처리한 후 0h, 12h, 24h, 36h, 48h째의 세포를 sampling하여 분석하였다.

10. Limiting dilution assay

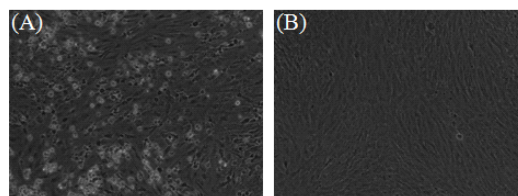
PI-PMF 상등액 속에 있는 바이러스의 오염을 최소화하기 위해 washing 과정을 세 번 실시하였다. 채 부유시킨 세포는 1 cell/100 μ l/well의 농도가 되도록 96 well cell culture plate에 seeding한 후 20일 째에 도립 현미경으로 (100×) 세포를 관찰하였다. 세포의 존재가 확인된 양성의 well 상등액 2 μ l를 직접 PCR template로 사용하여 1-step PCR을 실시해 상등액 내의 virus 생산 여부를 판정하였다. 이러한 과정에서 세포는 자랐으나, 바이러스는 검출되지 않은 well의 세포는 다시 동일한 방법으로 limiting dilution을 세 번 실시하여

virus-free PMF cell(VF-PMF) cloning 하였다.

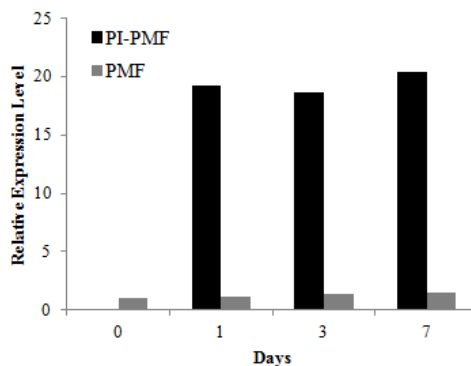
III. 연구 결과

1. PI-PMF 세포의 확립

PMF 세포에 바이러스 접종 후 10회의 계대배양을 통해 확립된 PI-PMF는 반짝이며 둥근 형태의 CPE를 보이며([Fig. 1], A 참조), 그 세포 상등액 속의 농도는 배양기간 동안 약 10⁸~10⁹ copies/ml을 유지하였다(data not shown).



[Fig. 1] CPE with shiny and round cells under light microscope (100×) in PI-PMF (A) after 10 times of subculturing. (B) PMF cell.



[Fig. 2] Relative expression of Mx gene by $\Delta\Delta$ Ct method. PMF (grey bar), PI-PMF (black bar).

2. PI-PMF 세포의 Mx gene 발현 분석

PI-PMF를 T25 flask에 subculturing한 후 1일, 3일, 7일 째의 Mx 유전자 발현량은 비감염 PMF

보다 각각 19.29, 18.63, 20.39배로, 높은 수치를 보였다. 각 시기별 발현량의 차이는 뚜렷하지 않았지만 7일째에 가장 높은 발현량을 보였다. Negative control로서, PMF를 subculturing 후 1일, 3일, 7일째의 Mx gene 발현은, 0일 째에 비해 1.10, 1.36, 1.50배 증가하는 것을 확인하였다 ([Fig. 2] 참조).

3. PI-PMF 세포의 Apoptosis 분석

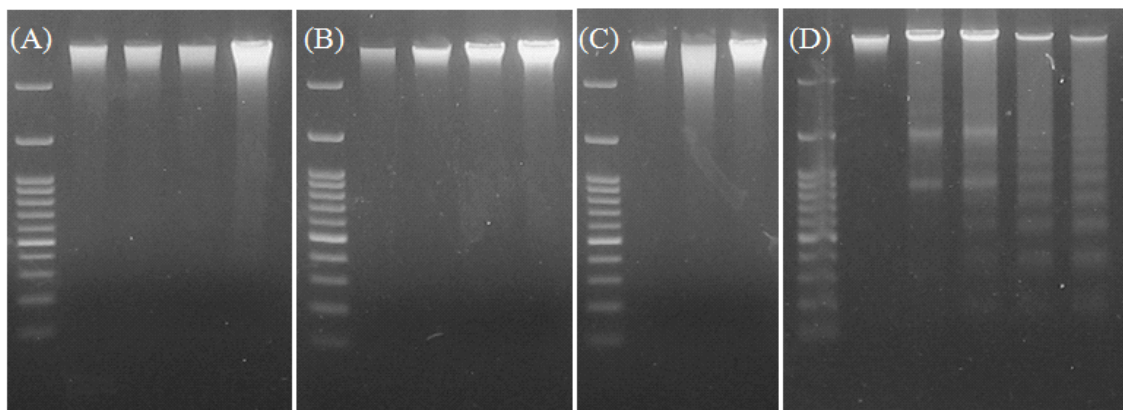
PI-PMF의 경우, subculturing 후 7일 째의 세포를 대상으로 한 4번의 반복실험 결과 모두 DNA fragment를 확인할 수 없었다. 한편, 비감염 PMF를 사용한 negative control의 경우, 배양 후 1일, 3일, 7일째 모두에서 DNA fragmentation 현상은 확인되지 않았다([Fig. 3], A, C 참조). 이러한 no DNA fragmentation 현상은 비감염 PMF에 바이러스를 새롭게 접종하여 0일, 1일, 3일, 7일째에 sampling한 세포 또한 같은 결과였다([Fig. 3], B 참조). 그러나 positive control로써 PMF에 Apoptosis 유도제인 DTT를 처리한 경우에는 DTT 처리 후 12h부터 fragment를 관찰할 수 있었으며 48h 까지 시간의 경과와 함께 그 정도는 더욱 명확해지는 것을 확인하였다([Fig. 3], D 참조).

4. PI-PMF 내 바이러스 감염 및 비감염 세포의 비율 분석

첫 번째 limiting dilution을 통해서 PI-PMF cell에서 바이러스에 감염되어 있는 세포의 비율을 확인하고자 하였다. 그 결과, 34개의 well에서 세포가 자란 것을 확인하였고, 그 중 25개는 바이러스가 검출되었고 9개는 검출되지 않았다. 또 세포는 관찰할 수 없었으나, PCR 양성반응을 보인 well의 수는 31개였다(<Table 2> 참조). 따라서, PI-PMF에서는 최소 58.3% ($25+31/96 \times 100$)의 세포가 바이러스에 감염이 되어 있으며 최소 9.4% ($9/96 \times 100$)의 세포는 PI-PMF 배양 상등액에 고농도의 바이러스가 존재함에도 불구하고 바이러스에 감염되지 않은 상태로 존재한다는 것을 추정할 수 있었다.

<Table 2> Number of wells showing cell or virus positive in 96 well plate

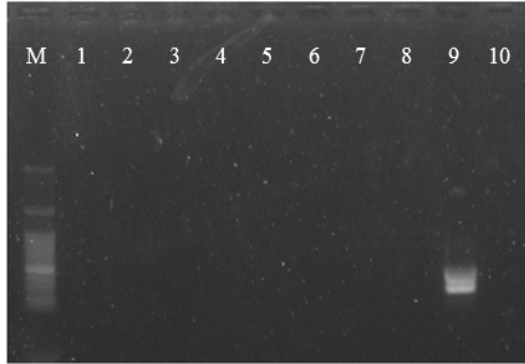
	Cell (+)	Cell (-)
Virus detection (+)	25	31
Virus detection (-)	9	31



[Fig. 3] Formation of the apoptotic DNA fragmentation (A) PI-PMF cultured for 7 days (four trials) (B) PMF on 0, 1, 3, 7 days after inoculation of virus (C) PMF on days 1, 3, 7 after subculture (D) PMF treated with DTT.

5. PI-PMF로부터 비감염세포의 cloning

PCR negative였던 9개 well의 세포를 대상으로 하여 다시 limiting dilution 과정을 세 번 반복함으로써 virus-free cell인 VF-PMF 4개를 cloning하였다. 이 VF-PMF가 처음에 존재하였던 wells의 number를 따서 VF8, VF91, VF64-1, VF64-2라고 명명하였다. Cloning한 4개의 VF cell은 24well과 T25 flasks에 단계적으로 계대 배양하였다. 이후 T25 flasks에서 계대 배양 3회 실시 후 채취한 PMF cell pellet과 상등액으로부터 각각 DNA를 분리하여 2-step PCR까지 수행한 결과, 바이러스를 검출할 수 없었다([Fig. 4] 참조).



[Fig. 4] Detection of megalocytivirus by 2-step PCR in culture supernatants of VF-PMF cells on day 7 after virus inoculation. Lane 1 to 4: culture supernatant of VF8, 91, 64-1, 64-2 respectively, Lane 5 to 8: VF8, 91, 64-1, 64-2 respectively, Lane 9: supernatant of PI-PMF (positive control), Lane 10: no template (negative control), M: DNA marker (100 bp ladder).

6. 분리된 비감염세포에 대한 바이러스 재감염 분석

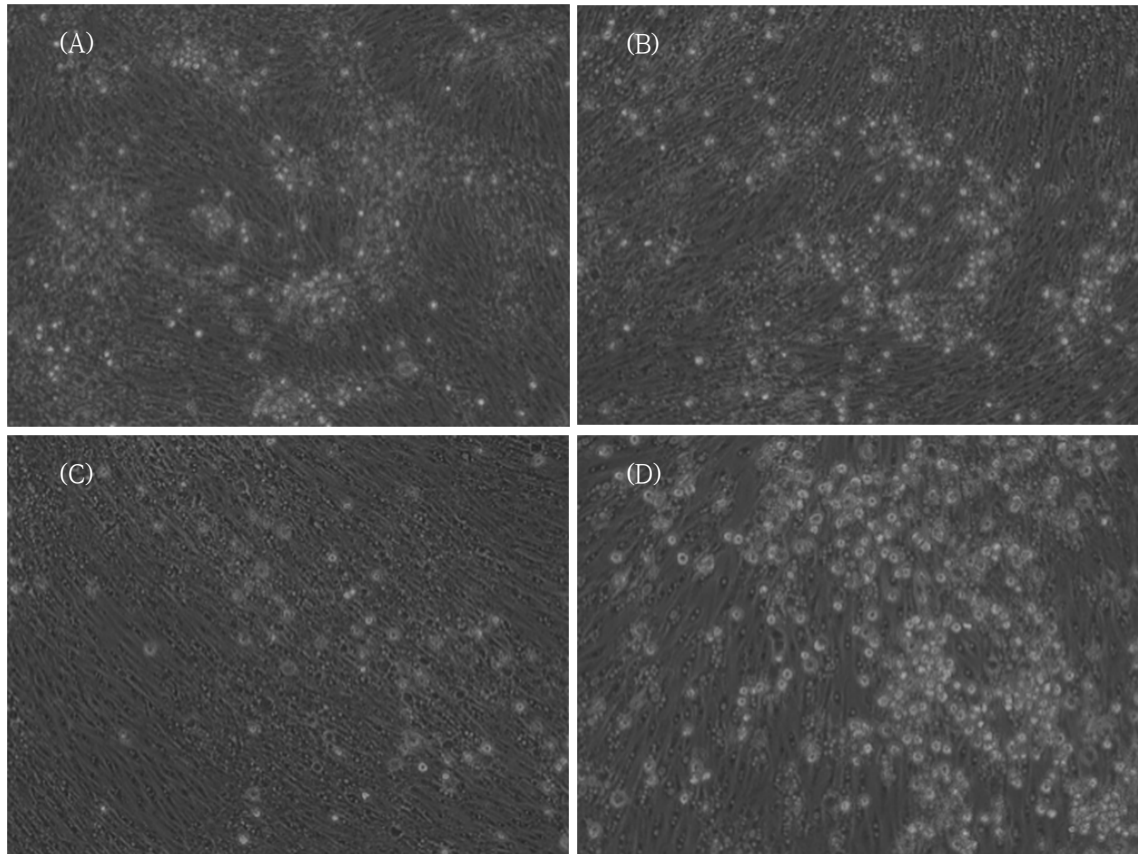
세포를 계수하여 10^5 cells/ml의 농도로 VF-PMF clone 4개를 T25 flask에 각각 식균한 후 3일째에 1×10^6 copies / flask의 농도로 바이러스를 접종

하였다. 접종 후 약 5일 쯤부터 반짝이는 CPE를 조금씩 확인할 수 있었으며, D+7일째에는 PI-PMF와 유사한 정도의 CPE를 확인할 수 있었다. 이런 바이러스에 대한 재감염은 4개의 clones에서 공통으로 관찰되었다 ([Fig. 5] 참조).

IV. 결론

PI-PMF는 Megalocytivirus subgroup 2 strain인 IVS-1이 연속적으로 감염되어 있는 PMF cell line으로, GF 또는 BF-2 cell line에 Megalocytivirus가 감염되는 경우와 달리, 수 많은 CPE를 형성하지만, 세포의 탈락이 일어나지 않으며, 계대하여 연속적인 배양이 가능하다(Yoon, 2015). 본 연구에서는 이러한 PI-PMF의 특성을 연구하여 바이러스 연속감염에 대한 이해를 높이고자 하였다.

바이러스 감염 세포의 complete destruction 또는 기능적 degeneration의 억제에 중요하게 작용하는 항바이러스 면역유전자는 바이러스의 연속 감염에서 중요한 역할을 한다(Robertsen, 2006). 이러한 항바이러스 면역유전자 중 가장 중요한 Mx protein은 type I interferon에 의해서 유도되는 항바이러스 단백질로, 많은 바이러스 억제 보고가 있으며, 특히 어류 바이러스의 억제효과 연구는 넙치유래세포에서 viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV)와 hirame rhabdovirus(HIRRV)의 증식을 억제한다는 보고가 있다(Caipanga et al., 2003). 또한 Jin(2014)은 바이러스 접종 이후 어체의 폐사율과 Mx 유전자 발현의 상관관계를 분석하였다. IVS-1을 10^5 copies/fish의 농도로 5~7g 돌돔과 참돔에 공격하였을 때, 100%의 폐사를 보인 돌돔과 달리 참돔은 20%의 폐사를 보였으며, 이의 원인으로서, 각 어류에서 접종 후 7일 쯤에 비장에서의 Mx gene의 상대발현을 분석한 결과, 33배 증가한 돌돔에 비하여 참돔의 경우에는 100배 이상으로 매우 높은 수준에 이르렀기 때문이라는 분석을 하였다.



[Fig. 5] CPE observation under light microscope (100×) on day 7 after virus inoculation on VF-PMF at a concentration of 1×10^6 copies/1.5 ml/flask. (A), (B), (C), (D): VF8, 91, 64-1, 64-2, respectively.

한편 바이러스의 연속감염에서 나타나는 Mx gene의 발현에 대한 여러 보고가 있으며 특히 어류의 경우, nervous necrosis virus(NNV)가 연속감염 되어 있는 barramundi brain(BB) cell line에서 Mx gene이 항상 높게 발현하는 것이 보고되고 있다(Wu and Chi, 2006).

본 연구에서는 PI-PMF는 비감염 PMF에 비해 Mx gene이 20배 이상의 높은 수준으로 발현되고 있었으나 in vivo에서의 결과와 같은 100배 이상의 높은 수준은 보여 주지 않았다. 참돔 비장에서 Mx gene 발현수치에 비해 참돔 지느러미 유래 세포인 PMF cell에서 낮은 수준의 발현량을 보이는 것은 in vitro에서는 일어날 수 없는 복잡한 상호 보완적인 다양한 host의 방어기작들이

관련된 것으로 보인다. 그러나 낮은 수준의 Mx 유전자 발현은 감염 PMF와 바이러스간의 biological balance를 이룸으로서 완전한 바이러스의 clearance 또는 완전한 세포의 파괴가 아닌 연속감염의 상태 유지에 중요한 요소로서 작용하는 것으로 추정할 수 있다.

바이러스에 감염된 세포는 바이러스의 증식을 저지하기 위해 Mx 단백질과 같은 면역 반응과 함께, Apoptosis를 통해 바이러스가 다른 주위세포로 전파되어 재감염되는 것을 차단함으로써 바이러스의 transmission cycle을 억제한다(Licata and Harty, 2003). Apoptotic DNA fragmentation은 바이러스에 감염된 세포에서 관찰될 수 있는 대표적인 현상으로, 바이러스 감염에 대한 숙주의 방어

기작 중 하나이다. Imajoh 등 (2007)에 따르면 subgroup 1에 속하는 RSIV에 비연속 감염된 GF cell line에서 Apoptosis가 일어나는 것을 관찰하였다. 그러나, 연속감염된 일부 동물세포의 경우에는 Apoptosis가 일어나지 않는 여러 보고가 존재한다. 대표적으로, 인간 유래 세포인 CD4+ Jurkat T-cell line의 경우, human immunodeficiency virus(HIV)가 연속적으로 감염되어 있으며, HIV가 암호화하는 E1B 19K protein이 세포의 Apoptosis를 억제함으로써 세포가 HIV에 persistent infection한 상태로 유도되어, 바이러스 배양 생산성이 높아졌다고 보고하였다(Antoni et al., 1995).

PI-PMF에서 Apoptosis가 일어나지 않는 정확한 mechanism에 대해서는 추가적인 연구가 이루어져야 하지만, Apoptosis가 일어나지 않는 것이 PI-PMF가 연속감염된 상태를 유지하는 것과 상당한 연관이 있어 보인다.

어류세포에서의 연속 감염에 대한 보고는 활발하게 이루어져 있지는 않다. 그러나 Betanodavirus의 연속감염에 대한 보고에서 감염 세포의 비율이 0.1 %에도 미치지 못하는 수준으로 나타났으며(Chi et al., 2005; Wu and Chi, 2006), 이러한 낮은 수준의 연속 감염은 IPN 바이러스에 의한 EPC cell에서도 유사하였다(Kim et al., 2012). 그리고 연속 감염 결과로 생산되는 바이러스의 양 또한 두 세포주 모두에서 매우 낮은 수준에 머무르고 있는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 보고 모두는 배양 상등액(released particles)과 배양 세포 내부에 존재하는(intra cellular particles) 바이러스를 검출하거나 또는 추정적인 감염:비감염 population 간의 바이러스의 양적 비교를 통하여 확인하는 간접적 방법에 의존하고 있다. 분명히 바이러스의 연속감염 상태를 유지하는데는 감염 세포와 비감염 상태에 있는 두 숙주 세포 population 간에서 나타나는 동적 평형 상태가 필수적으로 이루어져야 한다. 특히 BB 또는 EPC에서와 같은 낮은 수준의 바이러스 연속 감염(낮은 바이러스 생산량)에 비하여 높은 수준의 연속 감

염(높은 바이러스 생산량)을 보이는 Megalocytivirus 연속 감염의 경우는 이러한 동적 평형의 유지에 보다 여러 생리적 요소의 관여가 필요하다. 본 연구에서는 그 대표적인 요소로서 전술한 Mx 유전자 발현 그리고 Apoptosis 억제 등의 관여가 확인되었다. 그러나 이러한 결과와 더불어, PI-PMF 배양 도중에 상등액 내에 항상 존재하는 고농도의 Megalocytivirus에 의하여서도 비감염 상태로 있는 숙주 세포의 존재를 확인하고 분리하는 직접적인 분석이 함께 이루어져야 할 것이다. 따라서 PI-PMF에서 비감염 세포를 분리하고 이들 세포의 감염 세포에 대한 비율도 함께 분석함으로써 Megalocytivirus 연속감염의 기작을 보다 직접적으로 이해하고자 하였다.

Limiting dilution assay는 감염 세포를 희석하여 단일 세포 단위에서 바이러스 감염여부 분석과 single cell의 cloning을 가능하게 한다. PI-PMF를 96 well cell culture plate에 1 cell/well의 농도로 seeding한 후 20일 쯤에 96개 wells의 세포 성장 여부를 관찰하고 PCR로 배양 상등액 내의 바이러스 검출 여부를 분석하였다. 먼저, i) Cell(-)/Virus(-) well은 negative well ii) Cell(+)/Virus(+)은 positive well iii) Cell(-)/Virus(+)은 감염 세포의 lysis에 의한 intracellular 바이러스 검출 iv) Cell+/Virus- well은 비감염 세포를 의미한다고 할 수 있다. 감염 및 비감염 세포의 비율을 계산한 결과, PI-PMF에서는 최소 58.3%의 세포가 바이러스에 감염되어 있으며 최소 9.4% 이상의 세포는 상등액 속 고농도의 바이러스에 노출되어 있음에도 불구하고 감염되지 않은 상태로 존재하는 것을 알 수 있었다.

이 비감염세포로부터 추가로 세 번의 limiting dilution을 실시하여 4개의 virus free cloned cell (VF-PMF)을 얻은 뒤, 그 세포와 상등액으로부터 바이러스의 불검출을 확인하였다. 또한, VF-PMF가 바이러스에 저항성을 지녀 감염이 되지 않는 세포인지, 아니면 감염이 가능하지만 일시적으로 비감염 상태로 존재하였던 것인지 확인하기 위해

바이러스를 재접종하였다. 그 결과, 모두 IVS-1에 감염이 되는 것으로 확인되었고, 접종 이후 7일 이내에 CPE를 형성하였다. 그러므로 비록, PI-PMF는 betanodavirus 또는 IPNV 연속 감염 세포보다 훨씬 높은 수준의 감염 세포의 비율을 유지하지만, 분명히 감염된 세포와 감염되지 않은 세포 간의 homeostasis가 이루어지고 있으며 다만 그 비율의 차이가 있음을 확인하였다고 할 수 있다.

본 연구에서는 IVS-1에 연속적으로 감염되어 있는 PI-PMF cell line의 특성을 분석하여 연속감염의 mechanism을 분석하고자 하였다. PI-PMF는 상등액 속 고농도의 바이러스를 보임에도 불구하고, 계대배양을 통해 연속감염이 가능하며, 또한 일부세포는 바이러스에 감염되지 않은 상태로 존재하는 것을 확인하였다. 또한, PI-PMF의 non-Apoptosis와 높은 Mx gene 발현이 PI-PMF가 연속감염 상태로 존재하는데 중요한 요소로 작용하고 있는 것을 확인하였다.

References

- Antoni BA, Sabbatini P, Rabson AB and White E(1995). Inhibition of Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Cells Enhances Virus Production and Facilitates Persistent Infection. *Journal of Virology* 69, 2384~2392.
- Caipanga CMA, Hirono I, Aoki T(2003). In Vitro Inhibition of Fish Rhabdoviruses by Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology* 317(2), 373~382.
<http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.040>
- Chi SC, Wu YC, Cheng TM(2005). Persistent Infection of Betanodavirus in a Novel Cell Line Derived from the Brain Tissue of Barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 91~98. <http://doi.org/10.3354/dao065091>
- Choi JC(2016). Preparation of Megalocytivirus Vaccine for Increased and Protective Effects on Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School, Pukyong National University. Korea.
- Imajoh M, Ikawa T and Oshima S(2007). Characterization of a New Fibroblast Cell Line from a Tail Fin of Red Sea Bream, *Pagrus major*, and Phylogenetic Relationships of a Recent RSIV Isolate in Japan. *Virus Research* 126, 45~52.
<http://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.12.020>
- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K, Matsuoka M, Wada Y and Dorimachi M(1992). Iridovirus Infection of Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 27, 19~27.
<https://doi.org/10.3147/jsfp.27.19>
- Jin JW(2014). Development of a RSIVD Vaccine with In Vitro Cultural Characteristics of Megalocytivirus. Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School, Pukyong National University. Korea.
- Jin JW, Kim YC, Hong S, Kim MS, Jeong JB, Jeong HD(2017). Cloning and Expression Analysis of Innate Immune Genes from Red Sea Bream to Assess Different Susceptibility to Megalocytivirus Infection. *Journal of Fish Diseases* 40, 583~595.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12537>
- Kim HJ, Cho JK, Hwang HK, Oh MJ and Nishizawa T(2012). Establishment and Characterization of the Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) Cell Line Persistently Infected with Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), an Aquabirnavirus. *Journal of Microbiology* 50(5), 821~826.
<http://doi.org/10.1007/s12275-012-2364-2>
- Levine B and Griffin DE(1993). Molecular Analysis of Neurovirulent Strains of Sindbis Virus that Evolve during Persistent Infection of Scid Mice. *Journal of virology* 67(11), 6872~6875.
- Licata JM, Harty RN(2003). Rhabdoviruses and Apoptosis. *Int Rev Immunol* 22, 451~476.
<https://doi.org/10.1080/08830180305217>
- Nakajima K and Sorimachi M(1994). Biological and Physico-chemical Properties of the Iridovirus Isolated from Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology* 29, 29~33.
<http://doi.org/10.3147/jsfp.29.29>
- Robertsen B(2006). The Interferon System of Teleost Fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20(2), 172~191.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.010>

Wu YC, Chi SC(2006). Persistence of Betanodavirus in Barramundi Brain (BB) cell line Involves the Induction of Interferon Response. Fish and Shellfish Immunology 21, 540~547.

<http://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.002>

Yoon MJ(2015). Utilization of PMF Cell Line for Continuous Production of Megalocytivirus.

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School, Pukyong National University. Korea.

- Received : 31 October, 2019
- Revised : 03 December, 2019
- Accepted : 09 December, 2019