

생명정보학 기반 구제역바이러스 특이 진단을 위한 항원 단백질 epitope 선정

Selection of antigen epitope for Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) rapid diagnosis based on bioinformatics

서승환, 조시향, 이지후, 김학용
충북대학교 생화학과

Seung Hwan Seo, Si Hyang Jo, Jihoon Lee, Hak Yong Kim
Chungbuk National University

요약

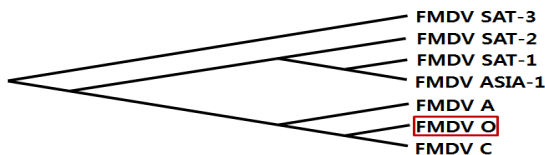
구제역은 소, 돼지 등 발굽이 두 개로 갈라진 가축들에게 감염을 유발하는 전염성이 매우 높은 바이러스성 질병이다. 구제역 감염 시 입 주변, 구강 내, 코, 발굽사이 등에 수포가 생기며 고열과 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 죽게 되는데, 강한 감염 전파력을 가졌음에도 치료제가 없고, 감염확인 즉시 확산 방지를 위한 살 처분만이 이루어지고 있다. 따라서 무엇보다도 빠른 감염 여부 진단이 중요하다. 현재까지 구제역을 진단하는 방법으로는 감염된 가축의 혈액에서 구제역 항원 단백질에 대한 항체형성 여부를 확인하는 항체진단법과 수포액과 같은 체액을 채취하여 세포배양을 통한 구제역 바이러스 분리방법이 있지만 두 가지 모두 짧은 잠복기를 갖는 구제역 바이러스를 빠른 시간 내 진단하기는 어렵다. 따라서 본 연구에서는 보다 빠른 구제역 진단 키트 개발을 위해 NCBI Pubmed를 이용하여 구제역바이러스가 가지는 6개의 주요 단백질을 확인하였고, NCBI BLAST를 이용하여 6개의 단백질 중 구제역 바이러스에 특이적인 항원 단백질 peptidase C28을 선정하였다. 선정된 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 IEDB analysis resource를 통해 peptidase C28의 epitope 부위를 예측하였다. 예측된 부위의 아미노산 서열을 NCBI BLAST에서 정상 동물과 비교하여 구제역바이러스 특이 항원 단백질 epitope peptide를 최종 선정하였다. 이를 이용한 구제역 바이러스 진단키트 제작은 보다 빠른 진단을 통해 감염 확산을 조기에 차단하고 경제적 손실과 피해를 최소화 할 수 있다.

I. 서론

구제역바이러스는 잠복기가 2일에서 8일로 매우 짧아 구제역에 감염된 동물에서 다른 정상 동물로 전염되는 속도가 매우 빠르다[1]. 따라서 무엇보다 신속 진단을 통한 감염 확산방지가 중요하다. 기존의 구제역 진단법의 경우, 구제역바이러스에 대한 면역반응으로 체내에 형성된 항체를 탐지하거나 중합효소반응(PCR)을 이용한 구제역바이러스 특이 유전자 검출여부를 확인하는 방법으로, 구제역 감염여부를 빠르게 진단하는데 어려움이 있다[2]. 따라서 우리는 생명정보학을 기반으로 구제역바이러스에 특이적인 항원 단백질을 선정하고 이를 이용한 epitope (항원결정부위) 예측 결과를 바탕으로, 신속 정확한 구제역바이러스 진단키트 개발 가능성을 제시하고자 한다.

II. 본론

구제역바이러스는 혈청형에 따라 크게 7가지로 구분되는데 우리나라의 경우, O형이 주요 감염원이다(그림 1).



▶▶ 그림 1. 구제역바이러스 7가지 혈청형 phylogenetic tree
FMDV O; 우리나라 구제역바이러스 감염 혈청형

1. 구제역바이러스 공통 항원 단백질 후보군 추출

NCBI를 통해 혈청형에 따라 7가지로 분류되는 각각의 구제역바이러스 전체 단백질 서열을 얻고 multiple alignment를 통해 각 혈청형에 공통적으로 존재하는 항원 단백질 후보군을 추출하였다(표 1).

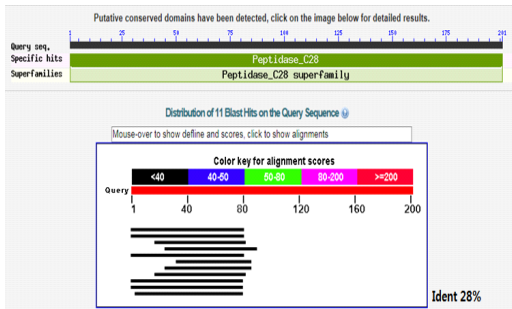
표 1. 구제역바이러스 공통 항원 단백질 후보군

구제역바이러스 공통 항원 단백질 후보군	
Peptidase C28	Host cell protein cleavage leader protease
VP4_2	Viral protein
rhv like	Picornavirus capsid protein domain_like
RNA helicase	Separation of double-stranded RNA
Peptidase C3	3C cysteine protease
RNA_dep_RNAP	RNA-dependent RNA polymerase

2. 구제역바이러스 특이 항원 단백질 선정

진단키트 제작을 위한 항원 단백질 선정에 있어 중요한 부분은 정상(음성)과 구제역 감염(양성)을 정확하게 진단 가능한 단백질이어야 한다는 점이다. 즉, 선정된 항원 단백질 후보군의 아미노산 서열과 유사한 서열이 정상 동물에서도 나타나는지 비교 분석할 필요가 있다. 따라서 우리는 소, 돼지, 말을 포함한 구제역바이러스에 감

염되는 주요 정상 반추동물 8 종을 선별하고, 앞서 NCBI에서 얻은 공통 항원 단백질 후보군 아미노산 서열을 Blast를 이용하여 비교해 본 결과, 8 종의 정상 동물에는 존재하지 않으며, 구제역바이러스에 특이적인 항원 단백질로 Peptidase C28을 선정하였다(그림 2).

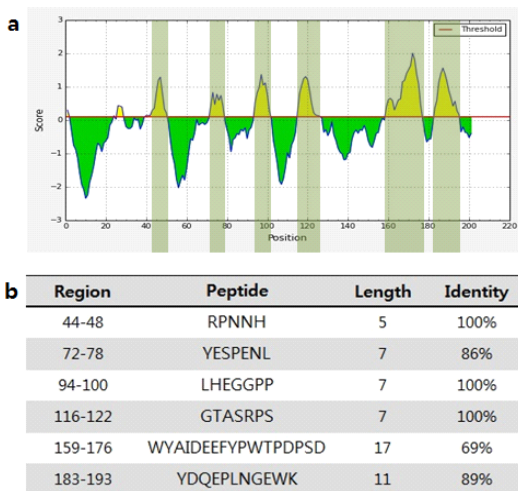


▶▶ 그림 2. 정상 반추동물 8 종과 peptidase C28 blast 결과

정상 반추동물 8 종과는 유사하지 않으며 구제역바이러스에 특이적인 항원 단백질 peptidase C28. 반추동물 8 종; 소(bos taurus), 돼지(sus scrofa domesticus), 말(equus caballus), 사슴(cervus nippon), 노루(capreolus capreolus), 염소(capra), 양(ovis), 낙타(camelus), Ident; Identity

3. Peptidase C28 epitope 예측 및 정상 동물과 아미노산 서열 비교

항원-항체 결합은 진단키트 원리의 가장 기본적인 반응으로써 특정 항원에 대한 면역반응으로 생성된 항체는 epitope에 직접 결합한다. 이러한 epitope는 항원 단백질 표면에 위치하고 이 부위에 항체가 특이적으로 결합 할 확률이 높다. 따라서 우리는 IEDB를 통해 최종 선정된 구제역바이러스 특이 항원 단백질 peptidase C28의 epitope를 예측한 결과, 총 6개의 peptides를 선별하였고, 각각의 peptide를 blast를 통해 정상 반추동물 8 종과의 단백질 아미노산 서열을 비교하였다(그림 3).

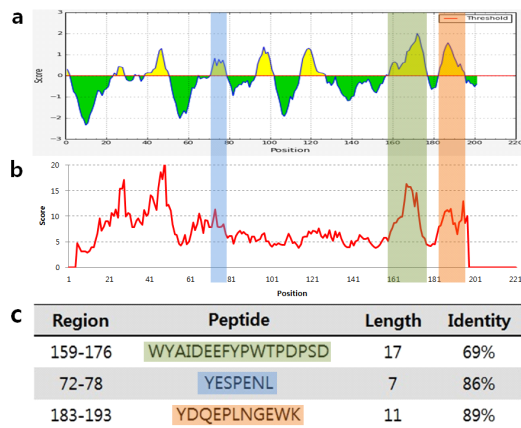


▶▶ 그림 3. Peptidase C28 epitope 예측 및 blast를 통한 정상 동물과 서열 비교

(a) IEDB, Threshold= 0.01, yellow, predicted epitope, (b) Identity; 아미노산 서열 간 유사한 정도 (높을수록 유사한 서열)

4. IEDB와 통합시스템 예측 결과 비교 및 최종 epitope 선정

Blast를 통해 epitope와 정상 동물 사이의 단백질 서열을 비교한 결과, identity가 100%인 서열을 제외하고 최종적으로 72-78번, 159-176번, 183-193번 서열을 epitope로 선정하였다(그림 4c). 또한 통합시스템을 이용한 결과에서도 최종 선정된 서열 부위 모두 epitope로 예측되는 것을 확인 하였다(그림 4a, 그림 4b).



▶▶ 그림 4. 최종 선정된 Peptidase C28 epitopes

(a) IEDB를 이용한 epitope 예측, (b) 통합시스템을 이용한 epitope 예측, (c) 최종 선정된 epitopes 아미노산 서열

Ⅲ. 결론

구제역바이러스는 짧은 잠복기와 강한 감염 전파력으로 감염 시, 많은 가축에 피해를 입히기 때문에 무엇보다 신속한 진단이 중요하다. 그러나 현재의 구제역 진단법은 이러한 신속 진단에 적합하지 않다. 따라서 본 연구에서는 생명정보학을 기반으로 구제역바이러스 특이 항원 단백질을 선별하고 그 단백질에 대한 epitope를 최종 선정하였다. 선정된 서열부위(epitopes peptide)는 구제역 바이러스 특이 진단이 가능하며 추후 이를 이용한 진단 키트 제작은 보다 빠른 구제역 확진을 가능도록 하여 구제역으로 인한 가축의 피해 및 경제적 손실을 최소화 할 수 있을 것이다.

■ 참고 문헌 ■

- [1] Marvin J. Grubman, "Foot-and-Mouth Disease", Clinical microbiology reviews, 2004, pp. 465-493
- [2] Scott M. Reid, "Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction", Journal of Virological Methods, 2001, pp. 167-176