

덴기 바이러스 진단을 위한 항원결정부위 예측 및 설계

Peptide Antigen Prediction and Design for Immunodiagnosis of Dengue virus Infection

이지 후, 이인성, 김학용
충북대학교

Jihoo Lee, In Seoung Lee, Hak Yong Kim
Chungbuk National University

요약

덴기 바이러스는 전 세계적으로 빠르게 확산되고 있는 모기 매개 바이러스이다. 현재까지 4가지의 혈청형이 알려져 있는 덴기 바이러스는 덴기열, 덴기 출혈열과 덴기 쇼크증후군 등을 유발한다. 현재 덴기 바이러스가 전 세계적으로 확산되고 있음에도 불구하고 확실한 치료제나 백신이 없기 때문에 초기 진단이 매우 중요하다. 아열대기후로 진입하는 우리나라에서도 흰줄숲모기가 자주 발견되기 때문에 이 질병으로부터 결코 자유롭지가 않다. 바이러스 감염을 진단하기 위한 진단키트를 개발하기 위해서는 타깃 유전자 부위 선정이 매우 중요하기 때문에 본 연구에서는 먼저 생명정보학을 기반으로 덴기 바이러스만을 특이적으로 검출할 수 있는 항원결정부위를 예측하고 진단키트에 적용하고자 하였다. 4가지 유형의 덴기 바이러스 유전자들을 찾고, ProtScale Tool 프로그램으로 친수성(hydrophilicity), 접근성(accessibility), 유연성(flexibility), 회전(β -turns) 등의 특성을 분석하여 항원결정부위를 선정하였다. 이 항원결정부위를 이용하여 단일클론항체를 제작하였으며 향후 진단키트로의 적용 가능성을 확인하였다.

I. 서론

현재까지 덴기 바이러스의 혈청형은 4가지(덴기-1, 2, 3, 4형)로 알려져 있고, 전 세계 인구의 40%가 감염위험에 노출되어 있으며 매년 2만 명이 사망하고 있다. 지구 온난화의 영향으로 아열대기후로 진입하는 우리나라에서도 덴기 바이러스 매개 모기인 흰줄숲모기가 자주 발견되기 때문에 이 질병으로부터 결코 자유롭지가 않다. 현재까지 가용할만한 백신이나 치료제가 없기 때문에 초기 진단이 매우 중요하고, 더욱이 환자의 진단에 있어서는 일본뇌염, 황열 및 웨스트나일 바이러스 감염과 거의 비슷한 임상증상(고열, 근육통, 발진)을 보이고 있어 조기 감별진단이 절대적으로 필요한 실정이다.

항체가 인지하는 항원의 일부분을 항원결정부위(epitope)라 하는데 하나의 항원에는 수많은 항원결정부위가 존재한다. 현재 항원결정부위 예측 분석 도구의 결과는 각 알고리즘의 특징과 목적에 따라 차이가 나타난다. 본 연구에서는 친수성(hydrophilicity), 극성(polarity), 파묻힘성(buried residues), 접근성(accessibility), 회전(β -turns), 유연성(flexibility) 등을 통합적으로 분석하여 덴기 바이러스에만 특이적인 항원결정부위를 선정하였으며, 이것에 특이적인 단일클론항체를 제작하여 진단키트로의 적용 가능성을 확인하였다.

II. 본론

1. 유전자 서열 추출 및 분석

덴기 바이러스 및 덴기 유사 바이러스인 일본뇌염 바이러스, 황열 바이러스와 웨스트나일 바이러스의 유전자 정보들은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 수집하였고, 친수성, 접근성, 유연성, 극성, 묻힘성, 회전성 등의 아미노산 서열의 특성은 ExPASy ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)을 이용하여 분석하였다.

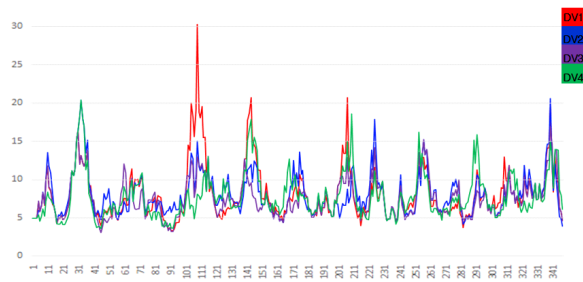
2. 연구방법 및 연구결과

진단을 위한 타깃 단백질은 외부경로와 직접적으로 상호작용하거나 환자의 혈액에 높은 농도로 존재해야 한다. 덴기 바이러스의 경우 NS1은 감염된 세포에서 세포 밖으로 분비되는 형태가 존재하며, 덴기 바이러스 감염 환자의 혈액에서 관찰이 될 정도로 높은 농도가 분비된다는 것이 보고되었기 때문에 진단을 위한 후보물질로 선정하였다.

항원결정부위는 수용성의 항체와 직접 결합하기 때문에 친수성 잔기가 차지하는 비율이 높은 부분에 존재할 가능성이 있으며, 이러한 친수성 잔기는 극성을 나타낸다. 또한 면역계가 쉽게 인지할 수 있도록 노출되어 있어야 하고, 긴 선상의 폴리펩티드 단백질이 전형적인 구상(globular form)을 형성하기 위해서는 이들 표면들에 사슬의 방향전환을 요구하는데, 이러한 완전한 방향전환에

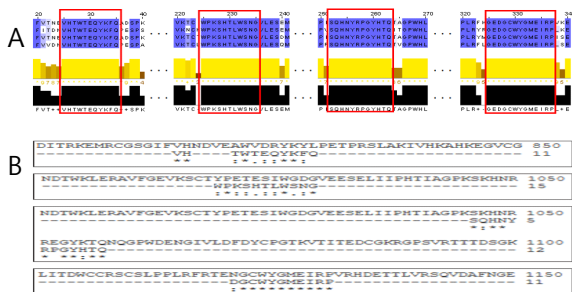
는 회전이 동반되며 이 부분에서 유연성이 나타난다. 그리고 주위의 아미노산 잔기들에 의해 과묵하지 않아야한다(1, 2). 이 같은 특성을 모두 만족하는 부위를 선별하기 위하여 인터넷상의 ProtScale tool 프로그램을 통해 항원 결정부위를 분석하였고 통합하였다.

친수성 및 극성 잔기가 높게 분포하며 회전하는 부위에 위치하고 접근성과 유연성이 높으면서 주위 잔기들에 의해 과묵하지 않는 부분은 5-12, 23-37, 105-117, 135-145, 201-209, 249-258, 287-295, 332-342 번째 아미노산 서열부위였다(그림 1).



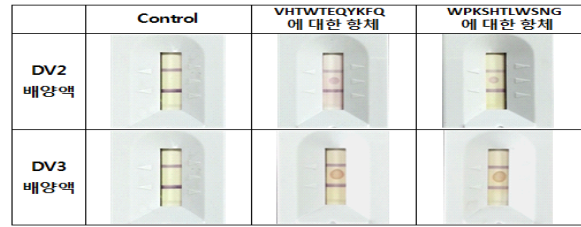
▶▶ 그림 1. 항원결정부위 예측 결과

진단을 위한 펩티드 합성의 경우 아미노산 길이가 10 mer 정도이며, 4가지의 탭기 타입을 동시에 진단하기 위해서는 동일한 서열을 가져야하므로 우리는 4개의 항원 결정부위를 선정하였다(그림 2A). 이 중 2개의 펩타이드 서열(SQHNYRPGYHTQ, CWYGMEIRP)은 탭기 유사 바이러스인 일본뇌염 바이러스와 유사한 서열을 갖기 때문에 제외하였고, 최종적으로 탭기 바이러스에만 특이적인 항원부위 2개(VHTWTEQYKQ, WPKSHT LWSNG)를 선정하였다(그림 2B). 이 펩타이드를 이용하여 쥐에게 면역화를 한 후 항체를 생산하는 세포와 암세포를 융합하였다. 이로부터 얻은 항체를 이용하여 native한 항원과 결합여부를 실험하여 진단키트로의 적용 가능성을 확인하였다(그림 3). 향후 그림 4와 같은 형태의 진단키트로 적용할 예정이다.

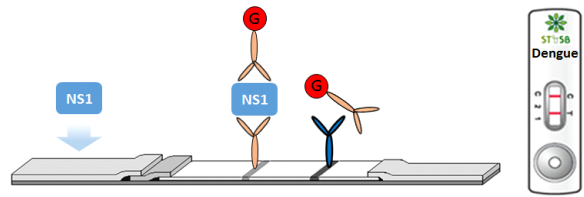


▶▶ 그림 2. 항원결정부위 서열분석

(A) 4 가지 탭기 타입간의 서열 분석, (B) 탭기 유사 바이러스인 일본뇌염 바이러스와의 서열 분석



▶▶ 그림 3. 항원-항체 결합반응 확인



▶▶ 그림 4. 신속진단키트의 구조

III. 결론

지구온난화의 영향으로 아열대에서 유행하는 탭기 바이러스 감염이 국제적으로 문제가 되고 있으며, 유사 질환인 일본뇌염 및 황열 등과의 감별 등 신속하고 정확한 진단이 필요하다. 하지만 현재 탭기 바이러스의 조기진단을 위한 진단키트는 민감도 및 특이도가 낮아서 진단 오류를 범할 수 있다.

본 연구에서는 생물정보학을 기반으로 탭기 바이러스에만 특이적인 항원결정부위를 선별하였으며, 진단키트로의 적용 가능성을 확인하였다. 이러한 생물정보학 기반 예측방법은 연구자들에게 실험의 실패 횟수 경감을 통한 연구효율 증가를 제공할 것이며, 이러한 방법을 통해 발굴된 펩티드나 도메인은 진단뿐만 아니라 백신개발이나 신약개발에도 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 현재까지 알려진 항원결정부위 예측도구의 결과 및 정확성은 알고리즘의 특징에 따라 차이가 있기 때문에 이들의 장점을 취합하여 복합적으로 분석하고 적용한 본 연구방법은 효율적이고 높은 정확성을 나타낼 것으로 사료된다.

■ 참고 문헌 ■

[1] Parker JM, Guo D, Hodges RS, "New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites" *Biochemistry*, 1986, 23; 25(19):5425-32.

[2] Larsen JE, Lund O, Nielsen M., "Improved method for predicting linear B-cell epitopes" *Immunome Res.*, 2006, 24;2:2.