

FMDV 2C Protein of Foot-and-mouth Disease Virus Increases Expression of Pro-inflammatory Cytokine TNF α via Endoplasmic Reticulum Stress

Hyo Rin Kang¹, Mi So Seong¹, Jin Ju Nah², Soyeon Ryoo², Bok Kyung Ku² and JaeHun Cheong^{1*}

¹Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Foot-and-Mouth Disease Research Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do 39660, Korea

Received February 25, 2020 / Revised March 9, 2020 / Accepted March 18, 2020

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), a member of the genus *Aphthovirus* in the *Picornaviridae* family, affects wild and domesticated ruminants and pigs. FMDV causes various clinical symptoms, including severe inflammation in infected tissue. Genome RNA of FMDV shows a positive single-strand chain approximately 8.3 kb long and encodes a single long open reading frame (ORF). The ORF is translated into structural and non-structural proteins by viral proteases. The FMDV 2C protein is one of the non-structural proteins encoded by FMDV and plays a critical role in FMD pathogenesis, including inflammation, apoptosis, and viral replication. In this study, we examined whether FMDV 2C induces intracellular expression of pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF α). FMDV 2C expression in pig IBRS-2 cells increased mRNA and protein expression of TNF α at the transcriptional level via activation of TNF α promoter. Treatment with 4-phenylbutyric acid, an endoplasmic reticulum (ER) stress reducer, decreased TNF α expression induced by FMDV 2C. Activating transcription factor 4 (ATF4), a transcription factor mediating ER stress response, induced transactivation of TNF α promoter and expression of mRNA and protein of TNF α . However, the dominant negative mutant of ATF4 did not induce FMDV 2C-mediated TNF α expression. The results indicate that FMDV 2C protein increases clinical inflammation via ATF4-mediated TNF α expression and is associated with ER stress induction.

Key words : ATF4, ER stress, FMDV, inflammation, TNF α

서 론

구제역바이러스(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)는 소와 돼지 등의 가축에서 심각한 질환을 일으키는 바이러스로서 Picornaviridae 과의 Aphthovirus 속에 분류가 된다. FMDV는 항원변이성과 유전자 변이가 높은 빈도로 발생하여 현재 7개의 혈청 형(A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2와 SAT3)을 가지고 있다[1]. DNA 서열 분석의 발달은 FMDV의 유전형과 표현형 변이체의 증가함을 보여주어 있다[4]. FMD는 급성 발열 반응과 입과 발에 수포의 형성이 보이며 임상 조직 부위에서 현저한 염증반응이 발생하는 특징을 나타낸다[2].

소포체는 칼슘이온의 저장, 지질 생성, 단백질 접합의 촉진, 그리고 합성한 단백질의 수송 등 많은 중요한 기능들을 수행한다. 소포체 스트레스는 정상적으로 접힌 구조를 가지지 않는 단백질 응집의 촉진이나 바이러스 감염 등에 의한 과다하

게 생성된 단백질들에 의해서 유도된다[8]. 소포체 스트레스는 신경 퇴행성 질환, 당뇨병, 동맥경화, 염증 질환, 심장 질환, 그리고 신장 질환 등 많은 질병들의 발생과 관련되어 있다. FMDV 감염 시 소포체 구조 변화 등 소포체 스트레스의 연관성이 알려져 있다[11].

FMDV 2C 단백질은 FMDV가 생성하는 바이러스 단백질들 중에서 변이가 적은 단백질이며, 다른 비슷한 RNA 바이러스들도 FMDV 2C-유사 단백질을 가지고 있다. FMDV 2C 단백질은 전체 318개의 아미노산으로 구성되어있고, FMDV RNA 복제복합체의 세포막 결합 인자로 기능을 한다[5]. FMDV 2C는 막의 재배열과 바이러스 복제 복합체 형성에 중요한 역할을 하며, FMDV에 의한 숙주세포 병리학적 현상을 유도한다[13]. FMDV 2C 단백질은 FMDV 감염세포에서 세포의 주변부에 응집하는 모습을 보이고 소포체에 위치하는 경향을 보인다[12]. 이와 같은 발견은 poliovirus에서 FMDV 2C 단백질이 소포체 막, 골지체, 리소좀에 위치하는 것과 일치한다.

최근 연구발표에서 FMDV 2C는 apoptosis 유도과 1형 인터페론 반응에도 관여함이 발견되었다[18]. FMDV 2C는 숙주세포 단백질인 Nmi와 결합하여 apoptosis를 유도하고 IFP35 단백질과 결합함으로써 1형 인터페론 반응을 유도하는 것으로 보인다. FMDV는 세포의 autophagy를 일으키는데, 이는 FMDV 2C가 autophagy에 관여하는 Beclin1 단백질과 결합하

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2277, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : molecule85@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

여 기능함을 보여주었다[18]. FMDV 2C 단백질은 FMDV 감염 동안 apoptosis, 면역반응, 그리고 autophagy 등의 복합적인 세포의 반응들을 통합하는 조절자로 기능을 한다[18]. 이 단백질은 세포의 치명적인 손상을 감소시킴으로써 바이러스의 생존과 증식을 증가시키고 바이러스 입자의 방출을 촉진시킨다. 이 연구에서 FMDV의 FMDV 2C 발현이 염증 유도 사이토카인 TNF α 의 발현 유도함을 확인하고 TNF α 의 발현을 증가시키는 전사인자를 분석하였다.

재료 및 방법

plasmid와 시약 준비

pCMV5-Myc-ATF4DN은 ATF4-full-F, 5'-CCT CTA GAA TGA CCG AAA TGA GCT TCC T-3'; ATF4-mutant-R, 5'-CGC CGC CGC TTC CAG GTA CCC AGT GGC TGC TGT CTT GTT TTG CTC-3'; ATF4-mutant-F, 5'-GGG TAC CTG GAA GCG GCG GCG GAG CAG GAG GCT CTT ACT G GT-3'; ATF4-full-R, 5'-AAG GAT CCC TAG GGG ACC CTT TTC TTC CC-3' 프라이머 세트로 PCR로 증폭하여 *Xba*I와 *Bam*HI 제한효소 자리를 이용하여 pCMV5-Myc 벡터에 클로닝하여 제작하였다. 모든 plasmid들은 DNA 서열 분석을 통해서 확인하였다. 4-phenylbutyrate는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)으로 부터 구입하였으며, 유전자 도입을 위한 PolyFect, jetPEI/jetPRIME and Lipofectamine는 각각 Qiagen (Hilden, Germany), PolyPlus Transfection (New York, NY, USA)과 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외의 시약들은 Sigma (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

세포 배양과 FMDV 감염 조직

돼지 신장상피세포주인 IBRS-2는 농림축산검역본부(김천, 대한민국)에서 얻었으며 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 37°C와 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 돼지의 FMDV 감염 조직도 농림축산검역본부에서 같은 돼지의 비감염조직과 함께 받아서 실험에 이용하였다.

Luciferase 레포터 활성 분석

세포들을 24-칸 배양 용기에 나누어서 배양하고 레포터 벡터와 β -galactosidase 발현 플라스미드를 각각 실험에 필요한 발현 플라스미드와 함께 세포 내에 도입하였다. 발현 벡터의 전체 양은 pcDNA3.1로 일정하게 맞추었다. 유전자 도입 24시간 후에 세포에 4-PBA를 12시간 동안 처리하였다. 유전자 도입 36시간 후에 세포들을 세포 용해완충액으로 용해시키고 luciferase 활성을 형광측정기를 이용하여 측정하였다. luciferase 활성은 β -galactosidase 활성을 이용하여 유전자 도입 효율을 맞추었다. 모든 실험은 최소한 3번 반복하여 수행하였다.

RNA 분리, reverse transcriptase (RT)-PCR와 real-time PCR 분석

전체 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen)을 사용하여 세포와 동물 조직으로부터 분리하였다. 전체 RNA를 oligo-dT와 MMLV 역전사효소(Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 단일 가닥 cDNA로 변환시켰다. real-time PCR의 반응 혼합물은 SYBR Green I에 맞는 LightCycler Fast DNA master mixture를 이용하여 준비하였다. PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다: ATF4 F, 5'-GGT CAG TCC CTC CAA CAA CAG C-3'; ATF4 R, 5'-GGA GTG GAG GAC AGG ACC CCT-3'; GAPDH F, 5'-GTG GTC TCC TCT GAC TTC AAC-3'; GAPDH R, 5'-TCT CTT CCT CTT GTG CTC TTG-3'.

Western blot 분석

세포는 PBS 완충액으로 씻고 용해시켜서 준비하였다. 단백질 농도는 BSA를 비교 군으로 하여 Bradford 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 결정하였다. 동량의 단백질들을 SDS-PAGE에서 분리하여 젤은 polyvinylidene fluoride (PVDF) 막 (Millipore)으로 이동시켰다. Western blot 분석을 위해서 막을 anti-HA (Roche), anti-ATF4 (sc-200, SantaCruz), anti-actin (A2066, Sigma)을 TBST 완충액으로 반응시켰다. TBST 완충액으로 3번 씻은 다음, 단백질이 있는 막을 peroxidase를 붙인 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 실온에서 30분간 반응시켰다. 단백질의 파악은 화학 형광 현상 시약(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 시각화 하였다.

통계적 분석

통계적 분석은 엑셀 프로그램을 이용하여 unpaired 또는 paired t test로 수행하였다. 모든 실험결과들은 \pm SD로 나타내었고, P 값은 <0.05이다.

결 과

FMDV FMDV 2C의 염증 유도 사이토카인 TNF α 발현에의 영향

FMDV 2C 단백질이 염증 반응에 관여하는 사실을 알아보기 위해서, 염증 유도 사이토카인으로 알려진 TNF α 의 발현을 조사하였다. Fig. 1A에서 TNF α 유전자의 발현 조절 영역(프로모터)이 luciferase 레포터에 연결된 벡터와 FMDV FMDV 2C와 3B 단백질을 코드하는 유전자 발현 벡터를 함께 IBRS-2 세포에 도입하였다. 3B 단백질은 FMDV 게놈의 복제 개시 과정에서 기능을 하는 단백질로서 FMDV 2C 단백질에 대한 비교 군으로 사용되었다. FMDV 2C 또는 3B에 의한 TNF α 발현 유도는 TNF α 프로모터 활성으로 인한 luciferase 생성 차이로 측정하였다. Fig. 1A에서 보듯이, 다른 2개의 FMDV에서 유래한 FMDV 2C 유전자의 도입은 TNF α 프로모터의 활성을

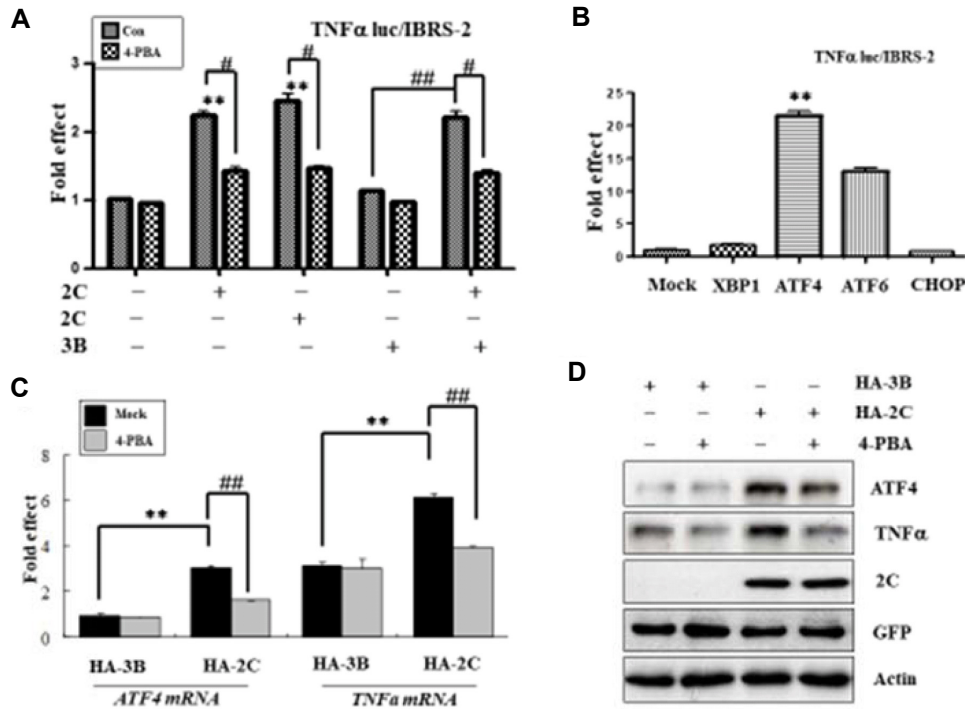


Fig. 1. FMDV 2C increases expression of pro-inflammatory cytokine TNF α . (A) FMDV 2C increases TNF α promoter activation. After transfection of expression plasmids for HA-FMDV 2C and HA-3B with TNF α promoter reporter plasmid into cells, luciferase activity was measured using cell extracts by luminometer. 4-PBA was treated to cells after 24 hr transfection and incubated 12 hr. Data shown are the mean \pm SEM from three independent experiments. ** p <0.01, #/## p <0.05 compared with corresponding value for mock transfected cells. (B) Transcription factors involving ER stress increases TNF α transcriptional activation. We transfected expression plasmids of ER stress transcription factors (XBP1, ATF4, ATF6 and CHOP) into cells. The promoter activation of TNF α was measured by relative luciferase production. Data shown are the mean \pm SEM from three independent experiments. ** p <0.05 compared with corresponding value for mock transfected cells. (C) FMDV 2C increases mRNA expression of ATF4 and TNF α . After transfection of HA-FMDV 2C and HA-3B expression plasmids, mRNA production of ATF4 and TNF α was measured by RT-PCR. ** p <0.01 compared with corresponding value for mock transfected cells and ## p <0.01 compared with corresponding value for mock transfected cells. (D) FMDV 2C increases protein expression of ATF4 and TNF α . After transfection of HA-FMDV 2C and HA-3B expression plasmids, protein production was analyzed by Western blot assay.

증가시킨 반면, 3B 발현은 TNF α 전사 활성 증가 효과가 거의 없었다. TNF α 의 발현 유도에 소포체 스트레스가 관여할 수 있는 가능성을 검토하기 위하여, 세포에 단백질 폴딩을 도와주는 4-PBA를 처리하였다. 그 결과, 4-PBA 처리는 FMDV 2C에 의해서 증가한 TNF α 발현을 감소시킴을 보여주었다(Fig. 1A). 이 결과는 소포체 스트레스가 FMDV 2C에 의한 TNF α 발현 유도에 연관되어있음을 가르킨다.

FMDV 2C 단백질이 소포체에 존재하고, FMDV 감염세포에서 소포체 스트레스 발생이 알려져 있고 TNF α 발현도 소포체 스트레스 반응과 연관이 있기 때문에, 다음 실험으로 TNF α 의 전사 활성을 담당하는 소포체 스트레스 세포 인자를 탐색하였다. Fig. 1B에 보듯이, 소포체 스트레스 매개 인자인 X-box-binding protein 1 (XBP1), ATF4, activating transcription factor 6 (ATF6)와 CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)의 유전자들의 세포내 발현 벡터들을

TNF α 프로모터 레포터 유전자와 함께 세포 내로 도입하였다. 그 결과로서 ATF4 전사인자가 가장 높게 TNF α 전사 활성을 증가시켰다. 이 결과를 토대로, Fig. 1C에서는 FMDV 2C가 ATF4의 발현을 유도하는 가능성을 확인하였다. FMDV 2C와 3B 발현 유전자를 세포 내에 도입한 후 ATF4와 TNF α 의 발현 차이를 측정하였다. FMDV 2C는 3B와 비교해서 현저히 ATF4와 TNF α 의 mRNA 발현을 증가시킴을 알 수 있었다. Fig. 1A의 결과와 일치하게 4-PBA 처리는 FMDV 2C에 의한 ATF4와 TNF α 의 mRNA 발현 유도를 감소시키는 것으로 보아서 FMDV 2C에 의한 ATF4와 TNF α 의 생성은 소포체 스트레스와 연관이 있음을 제시한다. ATF4와 TNF α 의 단백질 생성 증가는 Western blot 실험을 통하여 확인하였다(Fig. 1D).

ATF4의 TNF α 발현에의 영향

AP-1와 NF- κ B 등과 같은 많은 전사인자들이 TNF α 의 전사

를 조절함이 알려져 있다. DNA 서열에서 전사인자 결합 부위들을 예상하는 프로그램인 TESS (Transcription Element Search System)을 이용하여 가능한 ATF4 결합 부위가 TNF α 프로모터 서열에 있음을 파악하였다. ATF4가 TNF α 의 전사 활성을 조절하는 전사인자로서의 기능을 검토하기 위하여 ATF4의 발현 유전자를 세포 내로 도입한 후 TNF α 프로모터의 활성화를 luciferase 생성으로 측정하였다(Fig. 2A). 세포 내에 ATF4를 과다 발현 시켰을 때 TNF α 의 mRNA 생성이 약 5배 증가함을 알 수 있었다. 이와 더불어, Fig. 2B에서 ATF4 발현에 의한 TNF α 단백질의 발현 유도를 확인하였다. TNF α 전사 활성에 전사조인자(coactivator)들의 기능이 알려져 있기 때문에, ATF4와 여러 전사조인자의 상호작용이 TNF α 발현에 미치는 영향을 분석하였다. Fig. FMDV 2C에 보듯이, 전사조인자인 CBP와 SRC1의 발현은 그 자체로는 TNF α 의 전사 활성에 큰 영향이 없지만, ATF4와 함께 발현되었을 시 증가효과를 있는 것을 알 수 있었다.

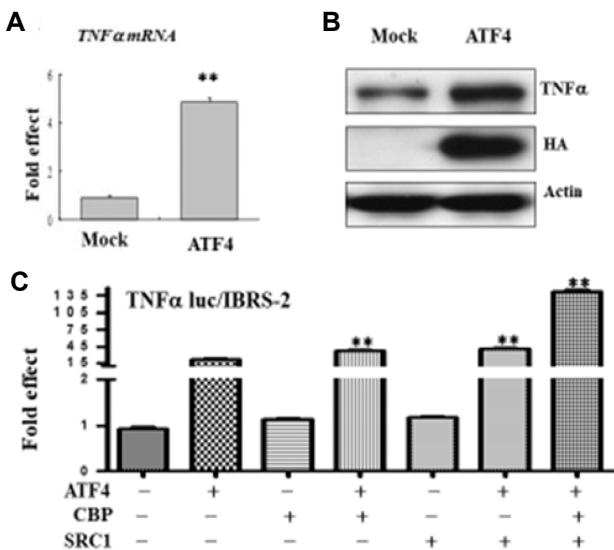


Fig. 2. ATF4 increases transcriptional activation and gene expression of TNF α . (A) ATF4 increases mRNA expression of TNF α . After transfection of ATF4 expression plasmid, mRNA production was measured by RT-PCR. Data shown are the mean \pm SEM from three independent experiments. ** $p < 0.05$ compared with corresponding value for mock transfected cells. (B) ATF4 increases protein expression of TNF α . After transfection of ATF4 expression plasmid, protein expression was measured by Western blot assay. (C) Coactivators increase ATF4-mediated TNF α transcriptional activation. After transfection of ATF4, CBP and SRC1, promoter activation of TNF α was analyzed by luciferase activity. Data shown are the mean \pm SEM from three independent experiments. ** $p < 0.05$ compared with corresponding value for mock transfected cells.

FMDV 2C의 ATF4 발현 유도가 TNF α 생성에의 영향

TNF α 발현 유도를 위한 FMDV 2C와 ATF4의 기능적 연합을 증명하기 위해서, FMDV 2C와 ATF4 세포내 mRNA와 단백질 발현을 각각의 유전자들을 세포 내에 도입한 후에 RT-PCR과 Western blot 분석을 수행하였다. ATF4가 TNF α 발현 유도에 기능하는 가능성을 검증하기 위하여 ATF4에 의한 TNF α 프로모터 활성화를 위한 luciferase 레포터 분석 실험을 시도하였다. 이에 대한 보강 실험으로서 ATF4의 DNA 결합 영역 (294RYRQKKR300 -> 294GYLEAAA300)에서 6개 아미노산을 치환한 ATF4-비활성화 단백질(ATF4 DN)을 이용하였다. Fig. 3A에서 보듯이, ATF4의 세포내 발현은 TNF α mRNA 생성을 증가시켰지만, ATF4 DN은 증가 기능이 없었다. TNF α 이외의 다른 종류의 염증 유도 chemokine인 SDF-1 α 의 발현도 함께 분석하였다. SDF-1 α 도 FMDV 2C와 ATF4에 의해서 발현이 증가하지만, ATF4DN은 FMDV 2C에 의해서 유도된 SDF-1 α 의 mRNA 생성을 감소시켰다(Fig. 3A). mRNA 생성 효과와 더불어서 TNF α 와 SDF-1 α 단백질의 발현 효과도 확인하였다. FMDV 2C를 정상적인 ATF4와 함께 세포 내에서 발현시켰을 때 TNF α 와 SDF-1 α 단백질 생성을 증가함을 Western blot 실험으로 알 수 있었다(Fig. 3B).

고찰

사이토카인들은 바이러스 감염 과정에서 염증반응의 매개인자로 기능을 한다. 사이토카인의 생성 양은 정상 상태와 바이러스에 감염되어 급성 질환을 보이는 동물조직에서 현저히 달라진다. FMDV 감염이나 백신접종 동안 질병의 발생 심각성에 따라서 다양한 사이토카인들의 증가로 인해 숙주 동물의 매우 상이한 면역 반응이 나타난다[2]. 염증 유도 사이토카인들 중에서 많이 알려진 TNF α 는 면역 시스템의 조절에 관여하는 것이 알려져 있다. TNF α 는 염증 조건에 대한 방어 기전이 있음에도 불구하고 많은 염증 질환의 병원성 매개인자로 기능을 한다[3]. 인체에서는 알츠하이머, 파킨슨병, 뇌경색, 관절염, 폐혈증 등 많은 염증 질환에서 TNF α 의 과다 생성이 관찰된다. 에이즈 바이러스나 인플루엔자 바이러스 감염의 경우에 TNF α 의 생성과 이와 연관된 염증반응의 증가가 보고되어 있다[6]. 돼지의 신장 세포에 FMDV를 감염시키고 세포 내에서 발현이 현저히 증가한 유전자들 RNA-seq 실험으로 분석한 결과를 보면, TNF α 와 관련인자들의 발현 증가를 관찰할 수 있었다[13, 16]. TNF α 의 발현의 증가와 함께 chemokine (C-X-C motif) ligand 2, chemokine (C-C motif) ligand 20, interleukin 6와 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 등의 염증 유도 사이토카인의 조절인자들의 발현 유도를 알 수 있다[17].

바이러스의 병원성은 바이러스의 세포내 도입, 숙주세포 내에서의 바이러스 복제, 그리고 완전체 바이러스 입자의 방출에 의해서 결정된다. 바이러스 생활주기 동안 소포체 스트레

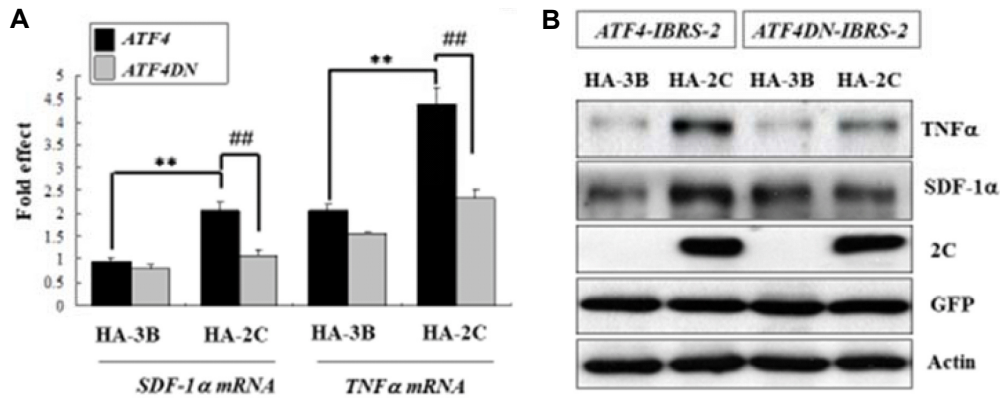


Fig. 3. FMDV 2C increases expression of TNFα and SDF-1α via ATF4 activation. (A) FMDV 2C increases mRNA production of TNFα and SDF-1α using ATF4 activation. After transfection of expression plasmids of HA-FMDV 2C and HA-3B with ATF4 or ATF4DN genes, mRNA production of TNFα and SDF-1α were measured by RT-PCR. Data shown are the mean ± SEM from three independent experiments. ** $p < 0.01$ compared with corresponding value for HA-3B transfected cells and ## $p < 0.01$ compared with corresponding value for ATF4 transfected cells. (B) FMDV 2C increases protein expression of TNFα and SDF-1α via ATF4 activation. After transfection of HA-FMDV 2C and HA-3B genes into the stable transfectants of ATF4 or ATF4DN genes, protein expressions of TNFα and SDF-1α were analyzed by Western blot assay.

스가 바이러스 단백질의 축적과 칼슘이온의 농도 이상 등으로 일어날 수 있다[14]. 소포체 스트레스는 c-Jun N-terminal kinase, XBPI, CHOP과 ATF4 활성화 경로 등을 통해서 세포 반응을 매개한다 [7]. 특히 ATF4는 소포체 스트레스와 연관된 기관지세포에서의 염증에도 관여하며, 신경세포의 염증반응에도 기능을 하는 것이 보고되었다[5]. 바이러스는 복제와 전파를 촉진하기 위해서 세포사를 유도하기도 한다[9]. 기관지염을 일으키는 코로나바이러스 감염은 감염 세포 내에서 eIFα-ATF4-CHOP 신호 활성화 과정을 증가시키는 것이 알려져 있다[10]. FMDV FMDV 2C 단백질은 소포체에 존재하면서 apoptosis와 autophagy에 관여함이 알려져 있으며 FMDV의 병원성 유도에도 관여한다[15]. FMDV의 임상적 증후로서 감염조직에서 과다한 염증반응이 관찰된다[1]. FMDV 2C 단백질은 FMDV 복제를 증가시키는 기능도 알려져 있다[15]. FMDV 복제는 소포체 내에서 일어나기 때문에 소포체에 존재하는 FMDV 2C의 기능은 바이러스 복제와 병원성 유도에 중요하다. 이 연구의 결과들은 FMDV 2C의 발현이 소포체 스트레스를 매개하는 전사인자인 ATF4의 활성화를 유도하고 ATF4가 염증 유도 사이토카인 TNFα의 발현을 증가시킴으로써 FMDV 감염이 보이는 염증 증후를 발생시킴을 제시한다.

감사의 글

본 논문은 농림축산검역본부 연구사업(세부과제명: 구제역 바이러스 유전자 변이특성을 통한 숙주민감성 조사, 세부과제번호: Z-1543082-2018-19-0102)의 지원에 의해 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Arzt, J., Baxt, B., Grubman, M. J., Jackson, T., Juleff, N., Rhyan, J., Rieder, E., Waters, R. and Rodriguez, L. L. 2011. The pathogenesis of foot-and-mouth disease II: viral pathways in swine, small ruminants, and wildlife; myotropism, chronic syndromes, and molecular virus-host interactions. *Transbound. Emerg. Dis.* **58**, 305-326.
- Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z. and Rodriguez, L. L. 2011. The pathogenesis of foot-and-mouth disease I: viral pathways in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **58**, 291-304
- Balkwill, F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 361-371
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. and Rock, D. L. 2005. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **79**, 6487-6504.
- Guo, Q., Li, H., Liu, J., Xu, L., Yang, L., Sun, Z. and Zhou, B. 2017. Tunicamycin aggravates endoplasmic reticulum stress and airway inflammation via PERK-ATF4-CHOP signaling in a murine model of neutrophilic asthma. *J. Asthma.* **54**, 125-133.
- Huo, C., Xiao, K., Zhang, S., Tang, Y., Wang, M., Qi, P., Xiao, J., Tian, H. and Hu, Y. 2018. H5N1 influenza A virus replicates productively in pancreatic cells and induces apoptosis and pro-inflammatory cytokine response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 386.
- Inoue, T., Yamakage, H., Tanaka, M., Kusakabe, T., Shimatsu,

- A. and Satoh-Asahara, N. 2019. Oxytocin suppresses inflammatory responses induced by lipopolysaccharide through inhibition of the eIF-2-ATF4 pathway in mouse microglia. *Cells* **8**, 527.
8. Lee, W. S., Yoo, W. H. and Chae, H. J. 2015. ER Stress and Autophagy. *Curr. Mol. Med.* **15**, 735-745.
9. Lee, Y. R., Kuo, S. H., Lin, C. Y., Fu, P. J., Lin, Y. S., Yeh, T. M. and Liu, H. S. 2018. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Rep.* **8**, 489.
10. Liao, Y., Fung, T. S., Huang, M., Fang, S. G., Zhong, Y. and Liu, D. X. 2013. Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Virol.* **87**, 8124-8134.
11. Midgley, R., Moffat, K., Berryman, S., Hawes, P., Simpson, J., Fullen, D., Stephens, D. J., Burman, A. and Jackson, T. 2013. A role for endoplasmic reticulum exit sites in foot-and-mouth disease virus infection. *J. Gen. Virol.* **94**, 2636-2646.
12. Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M. and Wileman, T. 2007. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2B protein is reproduced by coexpression of 2B with FMDV 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of FMDV 2C. *J. Virol.* **81**, 1129-1139.
13. Pasquereau, S., Kumar, A. and Herbein, G. 2017. Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: from immune activation to viral reservoirs. *Viruses* **30**, 64-80.
14. Salonen, A., Ahola, T. and Kääriäinen, L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 139-173.
15. Yuan, G., Shi-Qi, S. and Hui-Chen, G. 2016. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol. J.* **13**, 107-118.
16. Zhang, T., Chen, H., Qi, L., Zhang, J., Wu, R., Zhang, Y. and Sun, Y. 2018. Transcript profiling identifies early response genes against FMDV infection in PK-15 cells. *Viruses* **10**, 364-371.
17. Zhao, F. R., Xie, Y. L., Liu, Z. Z., Shao, J. J., Li, S. F., Zhang, Y. G. and Chang, H. Y. 2018. Transcriptomic analysis of porcine PBMCs in response to FMDV infection. *Acta Trop.* **173**, 69-75.
18. Zheng, W., Li, X., Wang, J., Li, X., Cao, H., Wang, Y., Zeng, Q. and Zheng, S. J. 2014. A critical role of interferon-induced protein IFP35 in the type I interferon response in cells induced by foot-and-mouth disease virus (FMDV) protein FMDV 2C. *Arch. Virol.* **159**, 2925-2935.

초록 : 구제역바이러스의 FMDV 2C 단백질은 소포체 스트레스를 통해서 염증 유도 사이토카인 TNF α 의 발현을 증가시킴

강효린¹ · 성미소¹ · 나진주² · 류소연² · 구복경² · 정재훈^{1*}

(¹부산대학교 분자생물학과, ²농림축산검역본부 구제역진단과)

구제역바이러스(FMDV)는 Picornaviridae 과의 Aphthovirus 속의 한 종류이며, 야생과 가축의 소와 돼지에 감염한다. FMDV는 감염 조직에서 중증의 염증반응을 포함한 다양한 임상적 증후들을 일으킨다. FMDV 게놈 RNA는 약 8.3 kb 길이의 양성-단일 가닥을 가지고 있으며, 하나의 긴 단백질 번역틀(ORF)을 만든다. 이 ORF는 바이러스의 단백질가수분해효소에 의해서 구조단백질과 비구조단백질로 나누어진다. FMDV의 FMDV 2C 단백질은 FMDV 유전자에서 만들어지는 비구조단백질로서 염증과 세포사를 포함한 FMD 병리 과정과 바이러스 복제에서 중요한 역할을 한다. 이 연구에서 우리는 FMDV 2C가 염증 유도 사이토카인인 tumor necrosis factor alpha (TNF α)의 세포내 발현을 유도하는 가능성을 검토하였다. FMDV 2C의 돼지 세포인 IBRS-2 세포내 발현은 TNF α 의 유전자 발현 조절 부위인 프로모터의 활성화를 이용하여 전사수준에서 TNF α 의 mRNA와 단백질 생성을 증가시켰다. 추가적으로, 소포체 스트레스를 감소시키는 화학물질인 4-phenylbutyric acid (4-PBA) 처리는 FMDV 2C에 의해 유도된 TNF α 발현을 감소시켰다. 소포체 스트레스 반응을 매개하는 전사인자의 한 종류인 ATF4는 TNF α 프로모터의 활성을 유도하고, TNF α 의 mRNA와 단백질 발현을 증가시켰다. 하지만, ATF4의 기능 결핍 돌연변이체 단백질의 발현은 FMDV 2C에 의한 TNF α 생성을 유도하지 못하였다. 이들 결과들은 FMDV FMDV 2C 단백질이 ATF4-매개 TNF α 발현을 통해 임상적 염증반응을 증가시키고, 이는 소포체 스트레스의 유도와 연관되어있음을 제시한다.