320058-02

구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구

2021

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( )발간등록번호(O)

가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-004135-01

구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구

2022.7.28.

주관연구개발기관 / 부산대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구"(개발기간 : 2020. 04. 30 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 7. 28

주관연구개발기관명 : 부산대학교 산학협력단 (대표자) 최경민 (인)
공동연구개발기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 정재훈
공동연구책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

보안등급
일반[0], 보안[ ]

중앙행정기관명	농림축산식품부	사업명	사업명	가축질병대응기술개발사업
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)	
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
		연구개발과제번호		320058-02

기술분류								
국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%		
농림식품과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%		

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문				
	영문				
연구개발과제명	국문	구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구			
	영문	Research on identification of transmission determining factor of FMDV and host and development of suppression technology			
주관연구개발기관	기관명	부산대학교	사업자등록번호	621-82-06530	
	주소	(우) 부산광역시 금정구 장전동 부산대학로	법인등록번호		
연구책임자	성명	정재훈	직위	교수	
	연락처 직장전화		휴대전화		
	연락처 전자우편		국가연구자번호		

연구개발기간	전체	2020. 04. 30 - 2021. 12. 31(1년 9개월)	
	단계 (해당 시 작성)	1단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)
		n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		513,000							513,000		513,000	
1단계	1년차	220,000							220,000		220,000	
	2년차	293,000							293,000		293,000	
n단계	1년차											
	n년차											

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
위탁연구개발기관	농림축산검역본부	차상호	수의연구관				

연구개발담당자 실무담당자					
	성명	성미소	직위	박사후연구원	
	연락처 직장전화		휴대전화		
	연락처 전자우편		국가연구자번호		

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 6 월 30 일

연구책임자: 정재훈

주관연구개발기관의 장: 부산대학교 산학협력단 회계팀장 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 농림축산검역본부장 박봉균 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술개발사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호	320058-02

기술분류								
	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	
연구개발과제명	구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구
전체 연구개발기간	2020. 04. 30 - 2021. 12. 31 (21개월)
총 연구개발비	총 513,000 천원 (정부지원연구개발비: 513,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)

연구개발단계	기초[0] 응용[ ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]	기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준( ) 종료시점 목표(0)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)			
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)			

연구개발 목표 및 내용		
	최종 목표	구제역 바이러스의 숙주별 감염 전파력(특성) 결정 인자 발굴 및 이를 바탕으로 하는 구제역 바이러스 전파 억제기술 개발 연구 ① 바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴 ② 숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴 ③ 전파력 인자들의 숙주별 특성 차이 비교 (20건 이상) ④ 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 10건 이상 확보 ⑤ 전파력 인자 바이러스 변이주들 3종 이상의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 연구 ⑥ 구제역바이러스 전파력 결정 인자를 표적으로 하는 억제 물질 3건 이상 발굴
	전체 내용	1. 바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴 ① CRE ② VP1 ③ 2C ④ 3C ⑤ 3D 2. 숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴 ① CSD protein ② integrin alpha5/beta6 ③ SREBP1 ④ FXRalpha ⑤ FGF11 ⑥ SFPQ ⑦ ER stress regulator 3. 전파력 인자들의 숙주별 특성 차이 비교 (20건 이상) ① FMDV CRE 숙주별 특화 변이 발굴 (5건 이상) ② 숙주별(돼지, 소) integrin 유전자 변이 특성 발굴 (2건 이상) ③ FMDV 2C 단백질 숙주별 유전자 차이 발굴 (3건 이상)

			④ VP1 결합단백질로서 occludin 단백질의 숙주별 아미노산 차이 발굴 (3건 이상) ⑤ FMDV 3C 숙주별 변이체 단백질의 protease로서의 기능 차이 발굴 (3건 이상) ⑥ FMDV 3D polymerase의 숙주별 FMDV 전사활성 차이 발굴 (4건 이상) 4. 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 10건 이상 확보 ① CRE RNA : T14G ② CRE RNA : C42T ③ 2C protein : C743T (T248I) ④ 2C protein : TTG(859-861)CCA/CAG (L287Q) ⑤ 2C protein : A713G (E238G) ⑥ 2C protein : GTA(846-849)ATG (V283M) ⑦ 3A protein : ACC(433-435)CCC/CCT (T145P) ⑧ 3D protein : GCA(97-99)GAG/GAC/GAA (A33E/D) ⑨ 3D protein : AGC(139-141)AAC (S47N) ⑩ 3D protein : TCC(691-693)GCC (S231A) ⑪ 3D protein : AGC(865-867)CGC (S288R) 5. 전파력 인자 바이러스 변이주들 3종 이상의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 연구 ① Wild type Shamir 및 Shamir mutants 3종- Cre, 2C, 3D 부위 ② 실험동물 : 구제역 항원/항체 음성 SPF 미니돼지 20두 병원성 실험용 약 8~12주령 그룹당 5마리씩 총 20두 6. 구제역바이러스 파력 결정 인자를 표적으로 하는 억제 물질 4건 이상 발굴 ① FGF11 ② SMA ③ z-gugglesterone ④ ribavirin
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	① FMDV의 숙주세포 유입, 유전자 발현, 복제 단계별 5건 발굴 ② FMDV CRE, VP1, 3D 전파역 인자와 결합하는 7건 숙주 단백질 발굴 ③ FMDV VP1과 2C에 의한 숙주세포 면역/소포체 스트레스 단백질 증가 분석과 세포 내 분포 확인 FMDV CRE, VP1, 2C, 3A, 3C, 3D 국내 발생 FMDV 변이 유전자 확보 FMDV CRE, VP1, 2C, 3A, 3D 변이 유전자 함유 바이러스주 11건 제작
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	① 특허등록된 구제역바이러스 감염 종특이성 판별 유전자 진단마커는 구제역 발생 초기에 소와 돼지 감염 특이성을 제공하여 백신주 선정 등 구제역 방역대책에 활용할 수 있음 ② 본 과제에서 제작한 구제역바이러스 전파력 관련 인자의 변이 유전자를 이용한 바이러스 변이주들은 돼지에서 백신의 copy number를 확보하는데 활용할 수 있음 ③ 본 과제에서 특허출원으로 산출된 구제역바이러스 전파력 억제 항바이러스 물질들은 숙주세포와 동물에서 안정성이 검증되었기 때문에 가축의 사료첨가제로 이용하면 구제역바이러스 초기 감염에서 예방대책으로 활용할 수 있음 FMDV 전파력 작용 억제 후보물질 4건 발굴: FGF11/SMA/gugglesterone/ribavirin
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	비공개를 희망함 사유: 최종보고서 내용에는 현재 투고 준비 중인 연구결과들이 많이 있음. 또한 구제

<table>
<tr><td></td><td colspan="11">역바이러스 항바이러스 물질들은 특허 신청과 기술이전을 준비하고 있기 때문에 연구종료 후 2년 까지 비공개를 희망함</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구개발성과의 등록・기탁 건수</td><td rowspan="2">논문</td><td rowspan="2">특허</td><td rowspan="2">보고서 원문</td><td rowspan="2">연구 시설 ・장비</td><td rowspan="2">기술 요약 정보</td><td rowspan="2">소프트 웨어</td><td rowspan="2">표준</td><td colspan="2">생명자원</td><td rowspan="2">화합물</td><td colspan="2">신품종</td></tr>
<tr><td>생명 정보</td><td>생물 자원</td><td>정보</td><td>실물</td></tr>
<tr><td></td><td>2</td><td>4</td><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>1</td><td>3</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구시설・장비 종합정보시스템 등록 현황</td><td>구입 기관</td><td colspan="2">연구시설 ・장비명</td><td>규격 (모델명)</td><td>수량</td><td>구입 연월일</td><td colspan="2">구입가격 (천원)</td><td>구입처 (전화)</td><td>비고 (설치장소)</td><td>ZEUS 등록번호</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2"></td><td></td><td></td><td colspan="2"></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>국문핵심어 (5개 이내)</td><td colspan="3">구제역바이러스</td><td colspan="3">바이러스 변이</td><td colspan="2">바이러스 전파력 인자</td><td colspan="2">바이러스 변이주</td><td>항바이러스제</td></tr>
<tr><td>영문핵심어 (5개 이내)</td><td colspan="3">foot and mouth disease virus</td><td colspan="3">virus variation</td><td colspan="2">virus transmission factor</td><td colspan="2">virus variant strain</td><td>anti-viral agent</td></tr>
</table>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 7

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 10

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 108

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) 116

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 118

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 118

7. 최종보고서의 수정, 보완 사항 120

연구개발성과 증빙자료 첨부 132

1. 연구개발과제의 개요

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2020)	구제역바이러스 전파력 결정인자 발굴 및 특성 분석	FMDV 전파력 단계별 결정 인자 발굴	♦ 2002년 발생부터 2019년 발생 까지 120건 이상의 국내 감염 구제역바이러스 전장 서열을 L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D의 기능별 유전자 부위를 구분하여 각각 기능적 변이체 단백질을 확보	전파력 5단계로 구분하여 인자 발굴 - 바이러스 세포인식 인자로서 VP1 변이체 5종류 확보 - 바이러스 게놈복제 인자로서 CRE RNA 6종류와 3B 3종류, 3D 5종류 확보 - 바이러스 단백질합성 인자로서 IRES 3종류, 3C 3종류 확보 - 바이러스 입자형성 인자로서 2C 7종류 확보 - 바이러스 입자방출 인자로서 2B 3종류 확보
		FMDV 단백질 변이체 기능 변화 분석	- mammalian two-hybrid assay를 통해서 VP1 변이체들과 integrin과의 결합변화를 분석 - 2C 단백질의 돼지세포에 발현시켰을 때 세포 소포체 스트레스 관련 단백질 생성 차이 분석 - RNA-protein 상호결합 실험을 통해서 CRE-3B-3D 기능 복합체 형성 변화를 분석	- 소와 돼지 유래의 다른 아미노산으로 구성된 VP1의 integrin(4개 이상 변이 발굴)과의 상호결합능의 변화를 규명 - 2C 변이체 단백질에 따라서 세포내 소포체 스트레스의 다른 영향을 분석 - 3B와 3D의 다른 아미노산 구성에 따른 복제복합체 형성의 차이를 분석
		FMDV 전파력 인자와 상호작용 하는 숙주 단백질 발굴	- FMDV 각 전파력 인자들을 in vitro에서 발현시킨 다음 돼지세포의 세포추출물을 column-affinity chromatography 방법을 이용하여 숙주 단백질들을 분리함. 분리된 숙주단백질들은 mass spectrometry 방법으로 동정함	- VP1과 결합하는 소/돼지세포의 숙주단백질로서 occludin 동정(5개 이상 변이 발굴) - CRE RNA와 상호작용하는 숙주단백질로서 돼지세포에서 PCBP2 분석(1개 변이 발굴) - 3D 단백질과 결합하는 돼지세포의 숙주단백질로서 splicing factor와 high density lipoprotein binding protien, cytoskeleton associated protein 4를 발굴

		FMDV 전파력 인자와 숙주 단백질 간의 상호작용 변화 분석과 세포 영향 분석	- 다양한 FMDV VP1 변이체와 숙주별 integrin alpha5 단백질의 상호작용 변화와 3B와 PCBP2 상호작용을 mammalian two-hybrid assay으로 분석 - 2C단백질의 숙주세포내 발현을 통한 염증반응인자 발현 조절 분석	- 다른 아미노산으로 구성된 VP1과 숙주단백질인 integrin alpha5의 상호작용 차이에 관여하는 아미노산 동정 - 3B와 PCBP2의 상호작용 변화에 관여하는 아미노산 분석 - 2C 세포내 발현은 소포체 스트레스를 유도하여 염증성 사이토카인 생성하는 과정을 규명
	구제역바이러스 전파력 결정인자 유전자 변이 분석	FMDV 전파력 결정인자들의 유전적 변이 분석	- 2002년부터 2019년 까지 국내 구제역 발생에서 획득한 FMDV 유전자의 서열을 확보하여 변이 분석 - 동남아시아와 중국을 비롯하여 국외발생 FMDV 유전자 서열을 확보하여 변이 분석	- 74종의 국내발생 FMDV 유전자와 32종의 국외발생 FMDV의 5개 다른 전파력 결정인자군 별로 구분하여 유전자 변이를 100개 이상 분석
		숙주 단백질의 소와 돼지에서 유전자 변이 분석	- FMDV 전파력 인자들과 상호작용하는 단백질로 동정된 숙주단백질들의 유전자들을 소와 돼지로 구분하여 유전자 서열 차이를 분석	- 소와 돼지세포의 integrin, occludin, PCBP2, PERK (5개 이상 변이 발굴), splicing factor (proline and glutamine rich) 유전자의 변이 차이를 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2021)	전파능력 결정인자 돌연변이 구제역바이러스 제작 및 억제물질 발굴	구제역바이러스 전파력 결정인자 변이체를 발현하는 바이러스 변이주 제작	♦ 전파력 결정 인자들의 유전자 변이 내용을 선정하고 Asia1/Shamir 바이러스주를 backbone으로 유전자 변이 내용을 함유한 바이러스 변이주 제작	- 구제역바이러스 CRE, IRES, VP1, VP3, 2C, 3A, 3C, 3D 전파력 인자들의 국내외 유전자 변이 내용을 분석 - 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 11건 제작: CRE (T14G, C43T), 2C (E238G, T248I, V283M, L287Q), 3A (T145P), 3D (A33E/D, S47N, S231A, S288R)
		FMDV 발현과 전파력을 억제하는 물질 발굴	구제역바이러스 항바이러스 물질 발굴을 위한 in	- 구제역바이러스 유전자 발현을 조절하는 5‘ UTR

			vitro 스크리닝 시스템 구축	유전자 부위를 luciferase 발현 벡터에 클로닝하여 in vitro reporter 시스템(FMDV 5'UTR-luc)을 제작 - FMDV 5'UTR-luc reporter 시스템을 돼지숙주세포 발현과 FMDV 유전자 발현 조절 기능을 검증
			구제역바이러스 복제와 전파력에 관련된 인자들의 기능을 표적으로 하는 억제물질 발굴	- FGF11은 구제역바이러스 유전자 발현과 연관된 PPAR와 SREBP와 같은 지질대사 전사조절인자의 기능을 표적으로 하여 선별되어 항바이러스 기능을 확인 - macrolactin A는 FMDV 3C protease와 3D polymerase와 결합이 가능한 물질로서 항바이러스 기능을 확인
	돼지 감염 모델을 이용한 바이러스 전파력과 병원성 분석	전파력 인자 바이러스 변이주들의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 분석	- FMDV 바이러스 변이주들의 돼지 감염에 의한 숙주동물의 바이러스 전파력과 병원성 차이 분석	- wild type Shamir 및 Shamir mutatns 3종: CRE, 2C, 3D 부위 변이주의 돼지 접종 - 바이러스 변이주의 돼지 감염 후 임상증상, 혈액 내 바이러스 양, 항체가, 부검에 따른 육안적 병리 검사를 수행함
		FMDV 감염 돼지 조직에서의 숙주단백질 발현 변화 분석	- FMDV 감염 조직에서의 숙주 면역성 단백질 차이 분석	- 2017년 연천 바이러스주와 2018년 김포 바이러스주로 감염시킨 돼지 조직에서 면역인자인 CXCR5와 SDF-1의 발현 변화를 분석

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) FMDV 전파력 단계별 결정인자 발굴

○ **전파력을 결정하는 바이러스 요소로서 5가지로 구분하여 단백질 기능 연구를 진행하였음**

: FMDV 전파력 관련 인자들을 5가지로 구분하였음. 국내 발생 18종 FMDV 유전자를 대상으로 비교 분석하였음

① 바이러스의 세포 인식 및 도입 : 바이러스 전파의 첫 단계로서 구제역바이러스의 VP1 단백질이 숙주세포의 integrin 단백질을 인식하여 세포 내로 들어오는 과정 – **분석 대상은 VP1/VP3 단백질**

- VP1 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VP1	T(18)	T(18)	S(13)T(3)A(2)	T(17)I(1)	G(18)	E(18)	S(18)	A(18)	D(18)	P(18)	V(18)	T(18)	A(11)T(7)	T(18)	V(18)	E(18)	N(18)	Y(18)	G(18)	G(18)

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VP1	E(18)	T(18)	Q(18)	V(10)I(7)T(1)	Q(18)	R(18)	R(18)	H(12)Q(4)Y(2)	H(18)	T(18)	D(18)	V(18)	S(16)G(2)	F(18)	I(16)L(2)	L(15)M(3)	D(18)	R(18)	F(18)	V(18)

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
VP1	K(15)Q(3)	V(15)I(3)	T(15)K(3)	P(18)	K(15)V(2)E(1)	D(15)G(2)S(1)	S(12)Q(4)P(2)	T(10)I(8)	N(15)H(3)	V(18)	L(15)I(3)	D(18)	L(18)	M(18)	Q(18)	T(17)I(1)	P(15)H(3)	P(9)A(4)Q(3)S(2)	H(18)	T(15)G(3)

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
VP1	L(18)	V(18)	G(18)	A(18)	L(15)M(3)	L(18)	R(18)	A(9)T(9)	A(18)	T(18)	Y(18)	Y(18)	F(18)	A(15)S(3)	D(18)	L(18)	E(17)	V(15)I(3)	A(15)V(3)	V(18)

	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
VP1	K(15)N(3)	H(18)	E(12)T(3)K(3)	G(18)	D(11)N(6)R(1)	L(18)	T(18)	W(18)	V(18)	P(18)	N(18)	G(18)	A(18)	P(18)	E(18)	A(15)V(2)T(1)	A(18)	L(18)	D(16)Q(2)	N(18)

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
VP1	T(18)	T(15)S(3)	N(18)	P(18)	T(18)	A(18)	Y(18)	H(18)	K(18)	A(18)	P(18)	L(15)F(3)	T(18)	R(18)	L(18)	A(18)	L(18)	P(18)	Y(18)	T(18)

	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
VP1	A(18)	P(18)	H(18)	R(18)	V(18)	L(18)	A(18)	T(18)	V(18)	Y(18)	N(16)S(2)	G(18)	N(15)T(3)	C(15)S(3)	K(17)R(1)	Y(18)	T(8)S(4)A(3)G(3)	G(10)E(2)D(2)R(1)	G(14)D(1)	S(10)A(7)P(1)

	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
VP1	L(11)V(4)P(3)	P(11)T(4)Q(2)A(1)	N(17)T(1)	V(14)R(3)A(1)	R(18)	G(18)	D(18)	L(17)S(1)	Q(14)G(3)H(1)	V(15)P(2)S(1)	L(18)	A(17)V(1)	P(7)Q(7)A(2)V(1)S(1)	K(16)R(2)	A(15)L(2)P(1)	A(18)	R(14)A(2)T(1)W(1)	P(11)T(4)Q(3)	L(18)	P(18)

	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
VP1	T(15)A(3)	S(18)	F(18)	N(18)	Y(16)F(2)	G(18)	A(18)	I(17)V(1)	K(15)R(3)	A(18)	T(17)H(1)	R(15)E(3)	V(15)I(3)	T(15)R(2)Q(1)	E(18)	E(18)	L(18)	L(18)	Y(15)V(3)	R(18)

	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
VP1	K(18)	R(18)	A(18)	E(18)	T(15)L(3)	Y(18)	C(18)	P(18)	R(18)	P(18)	L(18)	L(18)	A(18)	V(14)I(4)	H(15)E(3)	V(3)	P(15)S(2)T(1)	S(14)E(4)	A(11)Q(7)	A(15)D(3)

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
VP1	R(18)	H(18)	K(18)	Q(18)	K(18)	I(17)L(1)	V(15)I(3)	A(18)	P(17)S(1)	V(15)A(3)	K(18)	Q(17)P(1)	S(11)L(4)	L(15)

- VP3 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VP3	G(15)	I(15)	F(12)V(3)	P(15)	V(15)	A(15)	C(15)	S(15)	D(15)	G(15)	Y(15)	G(15)	G(15)	L(15)	V(15)	T(15)	T(15)	D(15)	P(15)	K(15)

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VP3	T(15)	A(15)	D(15)	P(15)	V(9)A(6)	Y(15)	G(15)	K(12)M(3)	V(15)	F(10)Y(5)	N(15)	P(15)	P(15)	R(15)	N(12)T(3)	M(12)N(3)	L(12)Y(3)	P(15)	G(15)	R(15)

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
VP3	F(15)	T(15)	N(15)	L(10)F(5)	L(15)	D(15)	V(15)	A(15)	E(15)	A(15)	C(15)	P(15)	T(15)	F(15)	L(15)	H(11)C(3)R(1)	F(15)	D(11)E(4)	G(12)D(3)	D(8)G(6)S(1)

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
VP3	V(12)K(3)	P(15)	Y(15)	V(13)I(2)L(0)	T(12)V(3)	T(15)	K(12)R(3)	T(15)	D(15)	S(12)E(3)	D(12)Q(3)	R(15)	V(12)L(3)	L(15)	A(11)T(4)	Q(12)K(3)	F(15)	D(15)	L(15)	S(15)

	81	82	83	84	85
VP3	L(15)	A(15)	A(15)	K(15)	H(15)

- VP1에 의한 소포체 스트레스와 지질대사 관련 유전자 발현에의 영향 분석: FMDV 바이러스 복제 환경은 세포소기관인 소포체 형성에 의존적임. 바이러스 복제와 단백질의 과다발현으로 인한 소포체의 바이러스 단백질 folding 능력을 초과하면 소포체 스트레스가 발생함. 또한 바이러스 복제로 인한 소포체 내의 지질 합성의 요구 역시 소포체 스트레스를 유도함. VP1 단백질 발현에 의해서 소포체 스트레스와 소포체 지질대사와 관련된 유전자 발현 영향을 조사하였음 (그림 1).

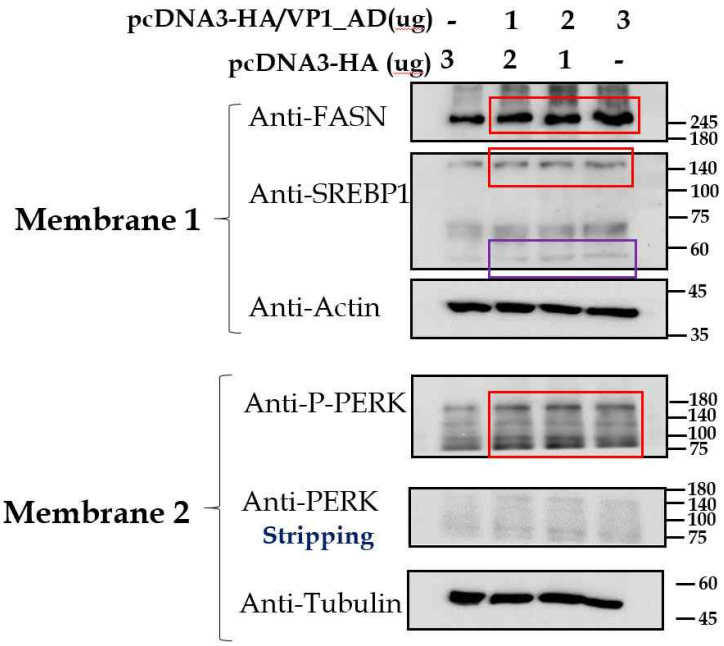


그림 1. VP1 단백질의 숙주세포 발현에 의한 fatty acid synthase, SREBP1, PERK 유전자 생성에 관한 영향 분석

- fatty acid synthase (FASN)은 숙주세포의 세포소기관인 소포체에서 지방산 합성을 촉매하는 효소로서 다양한 바이러스 종에서 발현이 증가함이 알려져 있음. 국내에서 발생한 구제역바이러스의 VP1 단백질을 돼지세포 내에서 발현시킨 결과, VP1 발현양에 비례하여 fatty acid synthease 단백질 생성이 증가하였음 (그림 1).

- SREBP1 (sterol responsive element binding protein 1)은 지질대사 효소들의 유전자 전사 활성을 조절하는 대표적인 숙주세포의 전사조절인자임. 다른 전사인자들과 다르게 SREBP1은 소포체에서 합성되어서 소포체 lumen 막에 삽입된 채로 있다가 지질 결핍 등의 활성화 신호가 오면 SREBP1 단백질의 일부가 절단되어 핵으로 들어가서 다양한 지질대사 효소 유전자의 sterol responsive element에 결합하여 전사 활성을 증가시킴. 앞선 결과에서 확인된 VP1에 의한 fatty acid synthase의 증가와 일치하게 돼지세포에서의 VP1 단백질 발현은 SREBP1 단백질 합성을 촉진시켰음 (그림 1).

- PERK는 다양한 바이러스의 감염과 복제시 숙주세포 내부의 소포체에서 바이러스의 capsid 단백질들을 대량으로 생성되면 소포에의 단백질 생성과 폴딩 능력에 과부하가 걸려서 소포체 스트레스가 발생할 때 이를 조절하는 조절단백질임. PERK의 기능이 활성화되기 위해서는 PERK 단백질의 인산화가 일어나야함. 그림에서 돼지세포의 VP1 단백질 발현이 PERK 단백질 생성에는 큰 영향이 없었지만 PERK 단백질 인산화는 크게 증가시킴을 알 수 있었음 (그림 1). 이는 구제역바이러스 VP1 단백질 발현이 소포체 스트레스와 관련이 있음을 제시함

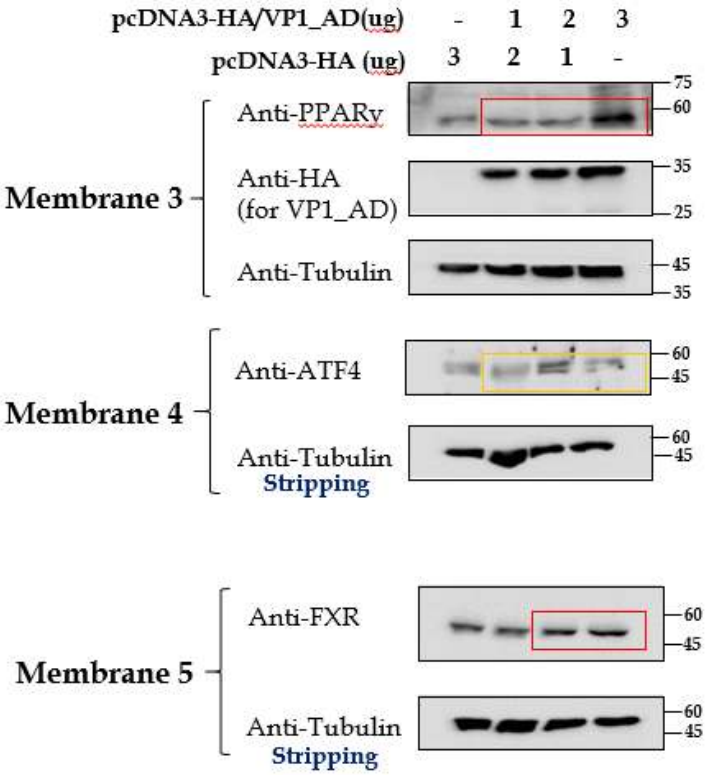


그림 2. VP1 단백질의 숙주세포 발현에 의한 PPARgamma, ATF4, FXR 유전자 생성에 관한 영향 분석

- PPARgamma (peroxisome proliperator-activated receptor gamma)는 SREBP1과 함께 대표적인 지질대사 인자들의 유전자 발현을 조절하는 핵수용체이면서 전사조절인자임. 앞에서 VP1에 의해 증가한 fatty acid synthase도 PPARgamma에 의해서 mRNA 발현이 증가함. 그림의 결과에서 보듯이, 돼지세포에서의 VP1 단백질 발현은 PPARgamma의 발현을 증가시켰음 (그림 2). 이는 VP1에 의한 PPARgamma의 발현 증가가 차례로 fatty acid synthease 생성을 촉진하고, 이에 따라 숙주세포에서 지질 합성이 증가함을 제시함

- FXR (farnesoid X receptor)는 콜레스테롤고 유사체에 의해 활성이 조절되는 핵수용체로서 다양한 바이러스 발현과 관련이 있음이 보고되어 있음. PPARgamma와 비슷하에 돼지 숙주세포에서 VP1 단백질에 의해서 FXR의 발현이 증가하였음 (그림 2). 이는 콜레스테롤과 유사체들이 구제역바이러스의 복제를 위한 소포체의 복제 복합체 형성 환경에 필수적이기 때문에 VP1에 의한 FXR의 발현 조절은 구제역바이러스의 복제와 연관하여 중요한 바이러스 전파의 분자마커로 활용할 수 있음

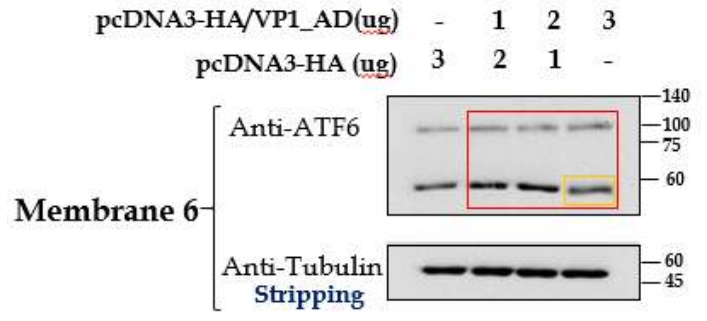


그림 3. VP1 단백질의 숙주세포 발현에 의한 ATF6 유전자 생성에 관한 영향 분석

- ATF6 (activating transcription factor 6)는 바이러스 복제에 필요한 capsid 단백질을 대량 합성할 때 유도되는 숙주세포 소포체 스트레스를 해결하기 위하여 필요한 단백질로서 소포체 스트레스를 경감시켜 바이러스 복제를 도와주는 역할을 수행함. 그림에서 VP1 단백질은 ATF6 생성을 증가시켰음 (그림 3). 이 결과는 VP1 단백질이 ATF6를 발현을 유도해서 구제역바이러스의 capsid 단백질들이 원활히 만들어져서 구제역바이러스 입자 형성을 도울 수 있음을 제시함

② 바이러스 게놈 복제능력 : 바이러스의 전파를 위해서는 다수의 바이러스를 재생산해야함. 이 를 위해서 구제역바이러스 RNA 전체 유전자를 복제하는 과정이 필요 - **분석 대상은 CRE RNA, 3A/ 3B/ 3D 단백질**

- **CRE 염기서열 변이 정리**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Cre	G(14)	T(14)	C(12)T(2)	G(14)	C(14)	T(14)	T(14)	G(14)	A(14)	G(14)	G(14)	A(13)T(1)	A(8)G(6)	G(14)	A(14)	C(10)T(4)	T(14)	T(14)	G(14)	T(14)

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Cre	A(14)	C(14)	A(14)	A(14)	A(14)	C(14)	A(14)	C(14)	G(14)	A(12)G(2)	C(7)T(7)	C(7)T(7)	C(7)T(7)	A(14)	C(10)T(4)	A(7)G(7)	C(14)	A(12)G(2)	G(13)A(1)	G(12)A(2)

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Cre	T(10)C(4)	T(13)C(1)	C(9)T(5)	C(14)	C(14)	A(12)G(2)	C(14)	A(14)	A(14)	C(14)	C(8)T(6)	G(12)A(2)	A(14)	C(14)

- CRE RNA는 구제역바이러스의 5‘ UTR 지역에 위치하며 구제역바이러스 전체 RNA 게놈의 복제를 개시하는데 필수적인 역할을 함. CRE RNA에 3B 단백질이 결합하여 RNA 복제를 위한 primer 역할을 하고 3D polymerase가 CRE-3B-3D 복제 복합체를 형성하여 구제역바이러스 RNA 게놈을 진행시킴

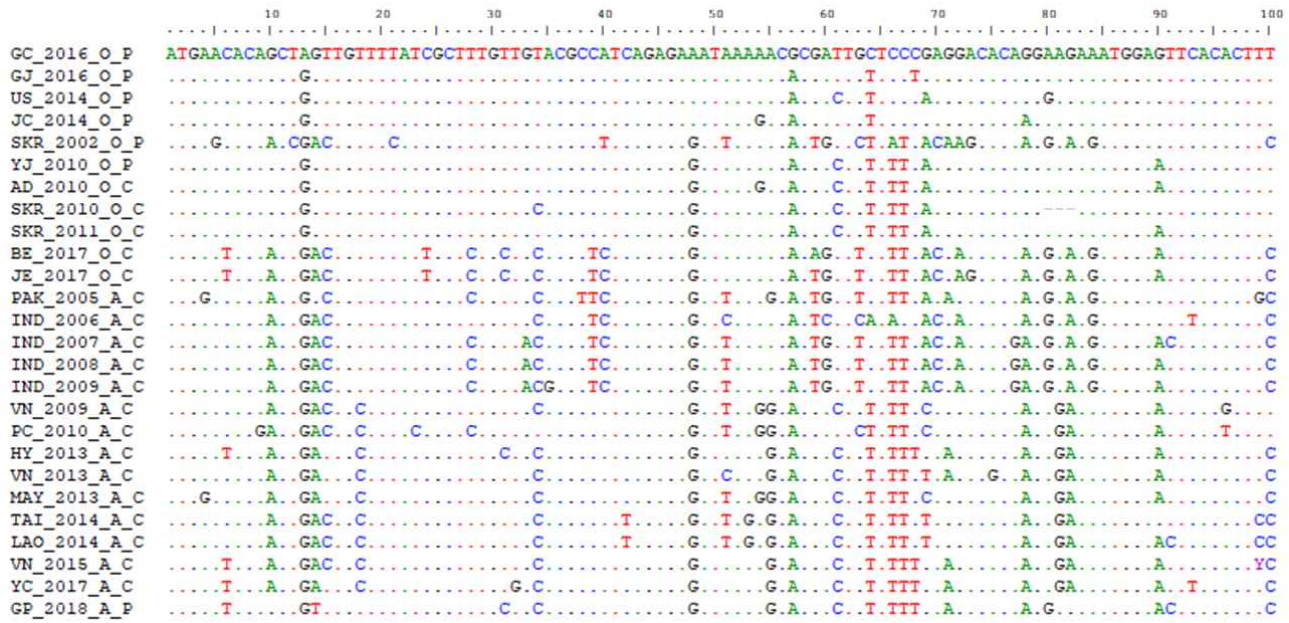
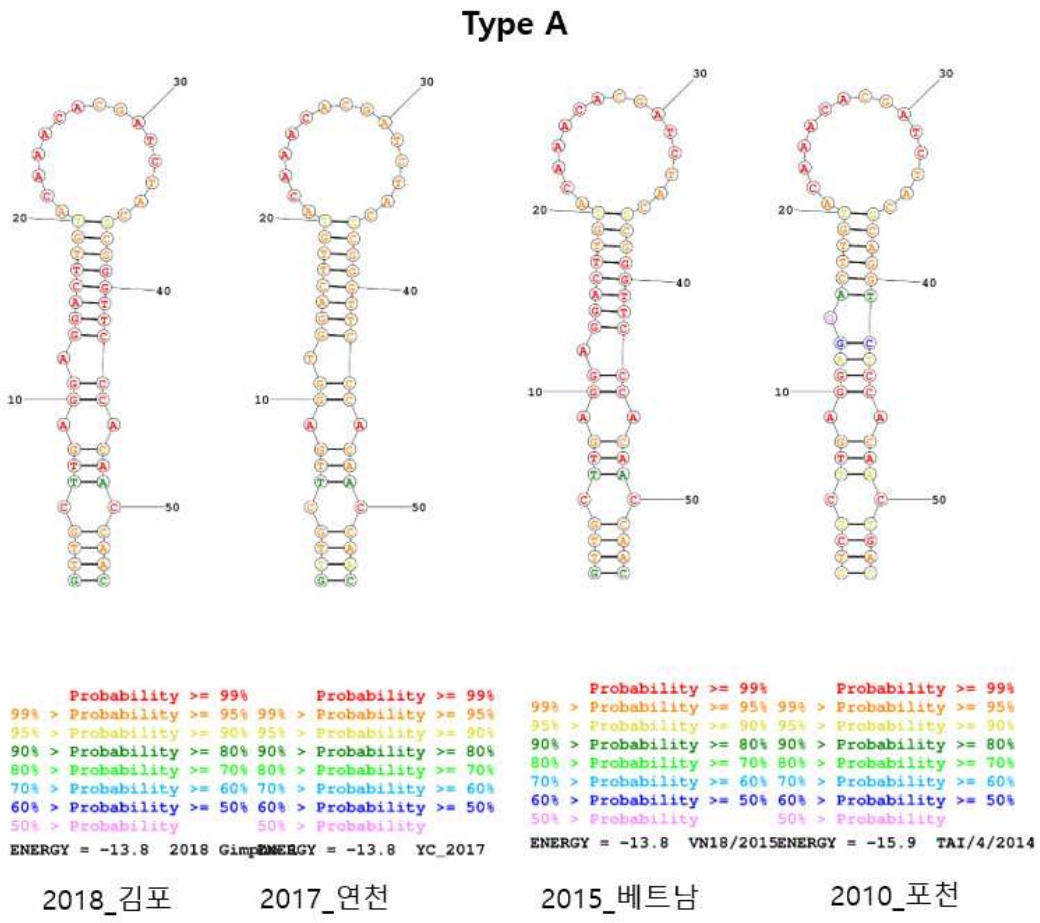


그림 4. 외국과 국내 FMDV CRE nucleotide 서열 비교 분석

- 계통분석을 위한 다중서열정렬(Multiple Sequence alignment, MSA) 도구로 MEGA X을 사용함. 다중서열정렬 알고리즘은 MUSCLE 알로리즘을 사용하였음. 클러스터링 알로리즘으로는 Neighbor Joining 방법을 사용하였음

- CRE의 54개 RNA nucletodies의 변이 서열 비교만으로도 지역별과 시기별 구제역바이러스의 상호관련성을 추적분석할 수 있음. 예를 들어, 국내 2017년 발생 구제역바이러스 CRE는 다른 국내 발생 바이러스 보다는 2005년 파키스탄과 2006~2009년 인도 발생 구제역바이러스와 유사함. 국내 발생 2014년과 2016년 구제역바이러스의 CRE 서열은 다른 어떤 바이러스들 보다 유사함 (그림 4).

- CRE RNA는 독특한 RNA 2차 구조를 가지고 있으며, 특정 2차 구조는 구제역바이러스와 숙주세포의 복제 관련 단배질들이 CRE RNA에 결합하는 플랫폼 역할을 함. CRE RNA의 염기서열 변이는 이러한 RNA 2차 구조의 변형을 가져오고 복제 조절 단백질들의 결합과 복제 효율에도 영향을 가지게 됨



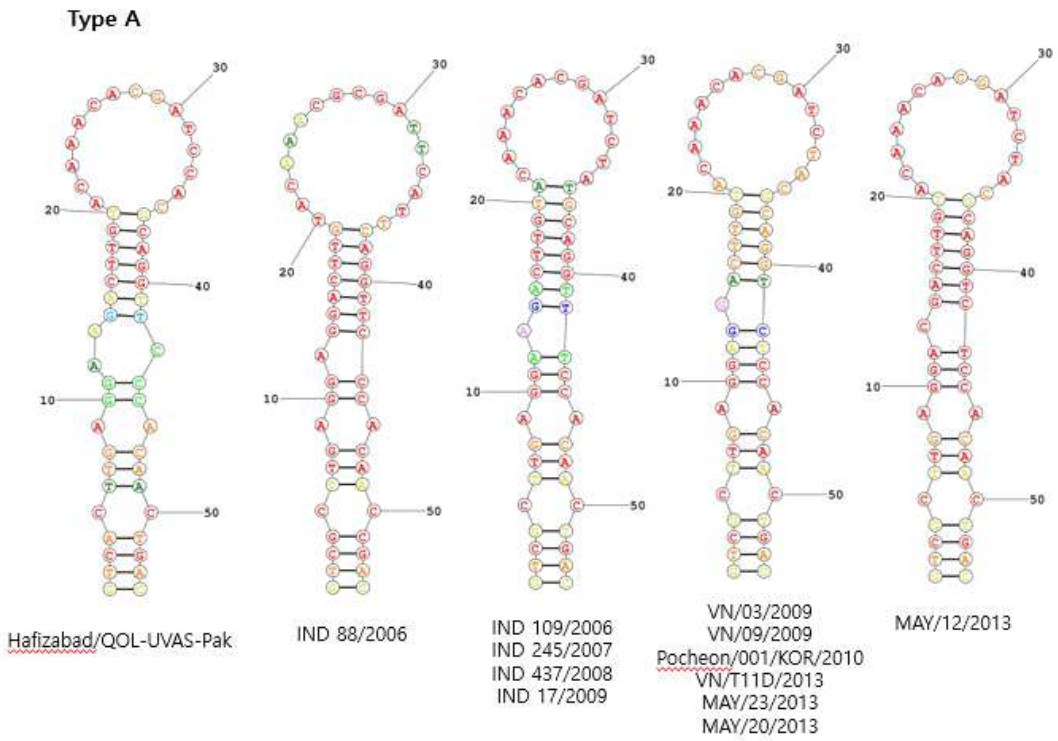


그림 5. 구제역바이러스 genotype A형의 CRE RNA 2차 구조

- 구제역바이러스 전체 54개의 RNA nucleotides로 CRE RNA의 2차 구조를 그림에 나타냈음. genotype A형의 다양한 국내외 발생 구제역바이러스의 CRE RNA 변이 서열을 획득하여 가장 안정적인 조건에서의 CRE RNA 2차 구조를 분석함. CRE RNA 2차 구조는 circle과 stem 그리고 몇 개의 다각형의 독특한 형태를 보여줌 (그림 5)

- 기본적으로 유사한 RNA 2차 구조를 보여주고 있지만, circle과 5각형 사이의 stem 길이가 다르고, 5각형과 6각형 사이의 stem 길이가 다름을 보여줌. 특히 circle 2차 구조는 구제역바이러스의 3B와 3D 단백질의 결합에 중요함 (그림 5).

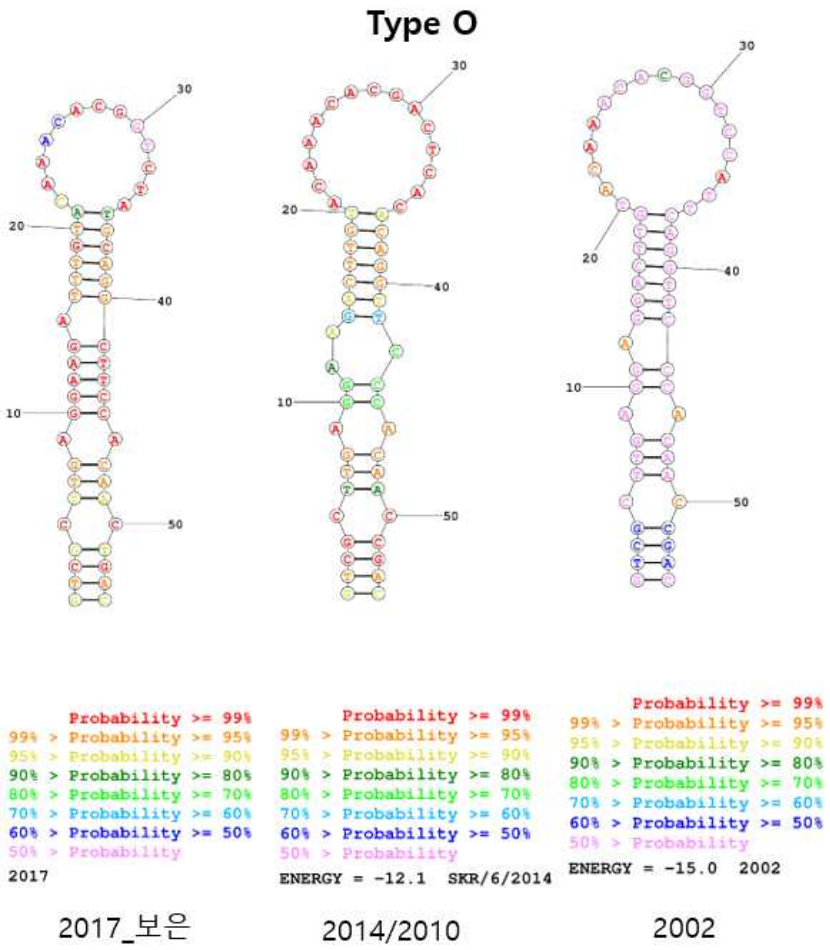


그림 6. 구제역바이러스 genotype O형의 CRE RNA 2차 구조

- genotype O형의 다양한 국내외 발생 구제역바이러스의 CRE RNA 변이 서열을 획득하여 가장 안정적인 조건에서의 CRE RNA 2차 구조를 분석함. O형에서는 다른 RNA 2차 구조와는 달리 5각형 대신 7각형의 형태를 가지고 있는 점이 독특함 (그림 6)

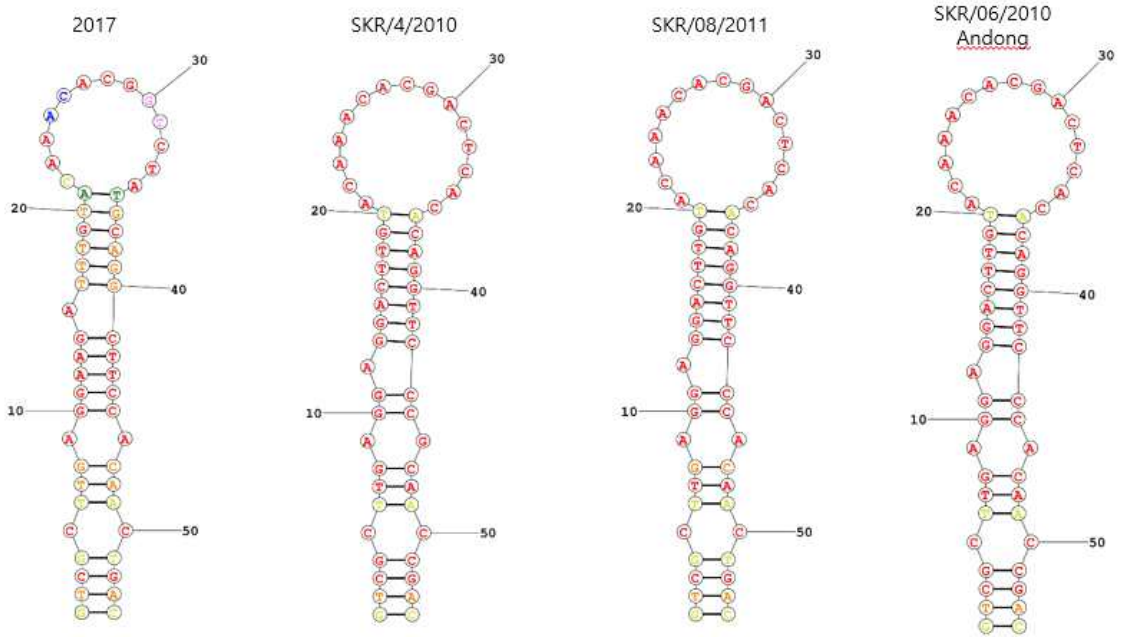


그림 7. 국내 발생 구제역바이러스 중에서 소에 감염된 바이러스 CRE RNA의 2차 구조

- 소에 감염된 구제역바이러스의 CRE RNA 2차 구조는 기본적으로 circle, stem, 5각형, 6각형으로 구성되어 있음. 바이러스 변이에 따라서 circle과 5각형 사이의 stem 길이가 다름 (그림 7)

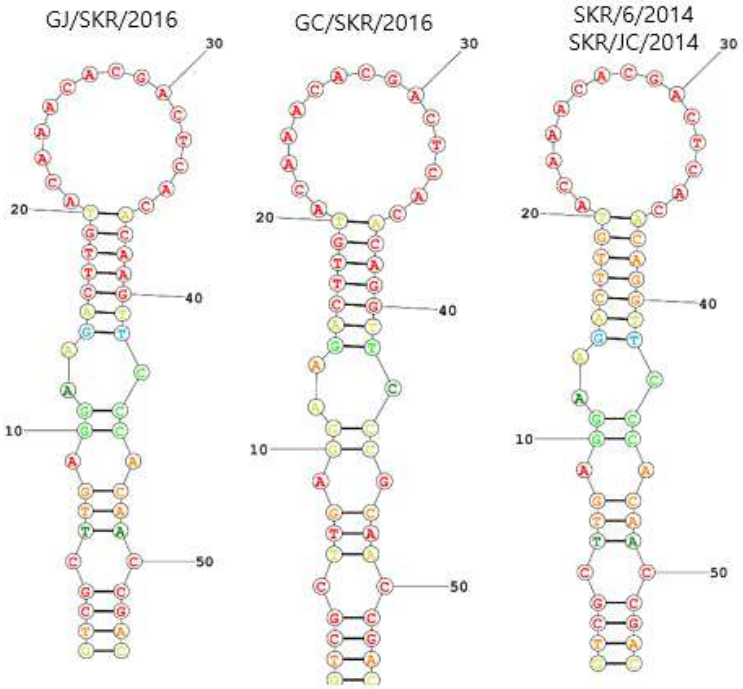


그림 8. 국내 발생 구제역바이러스 중에서 돼지에 감염된 바이러스 CRE RNA의 2차 구조

- 소 감염 구제역바이러스의 CRE RNA 2차 구조와는 달리 돼지 감염 구제역바이러스의 CRE RNA 2차 구조에는 circle 아래에 5각형 대신 7각형의 특이 구조가 형성되어 있음. 다른 RNA 2차 구조는 구제역바이러스와 숙주세포의 복제 조절 단백질들의 결합 효율성이 달라질 수 있음 (그림 8).

3A 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3A	I(14)	S(14)	I(14)	P(14)	S(14)	Q(14)	K(14)	S(14)	V(14)	L(14)	Y(14)	F(14)	L(14)	I(14)	E(14)	K(14)	G(14)	Q(14)	H(14)	E(14)
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
3A	A(14)	A(14)	I(14)	E(13)D(1)	F(14)	F(14)	E(14)	G(14)	M(14)	V(14)	H(14)	D(14)	S(14)	I(12)V(2)	K(14)	E(14)	E(14)	L(14)	R(14)	P(14)
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
3A	L(14)	I(12)V(2)	Q(14)	Q(14)	T(14)	S(14)	F(14)	V(14)	K(14)	R(14)	A(14)	F(14)	K(13)R(1)	R(14)	L(14)	K(14)	E(13)D(1)	N(14)	F(14)	E(14)
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
3A	I(9)V(5)	V(14)	A(14)	L(14)	C(14)	L(14)	T(14)	L(14)	L(7)M(7)	A(14)	N(14)	I(14)	V(14)	I(14)	M(14)	I(13)T(1)	R(14)	E(14)	T(14)	R(14)
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
3A	K(14)	R(14)	Q(14)	Q(14)	M(14)	V(14)	D(14)	D(14)	A(14)	V(14)	N(13)D(1)	E(14)	Y(12)H(2)	I(14)	E(14)	K(10)R(4)	A(12)T(2)	N(14)	I(13)T(1)	T(14)
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
3A	T(13)I(1)	D(14)	D(14)	K(14)	T(13)A(1)	L(14)	D(14)	E(13)G(1)	A(13)V(1)	E(14)	K(14)	N(14)	P(14)	L(14)	E(14)	T(13)I(1)	S(12)T(2)	G(14)	A(13)V(1)	S(14)
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
3A	T(14)	V(14)	G(14)	F(14)	R(14)	E(14)	R(13)I(1)	T(13)S(1)	L(11)P(3)	P(14)	G(14)	H(9)R(4) Y(1)	K(12)R(2)	A(7)V(5) T(2)	G(7)S(7)	D(12)G(2)	D(14)	V(14)	N(10)S(4)	S(9)Y(4) T(1)
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153							
3A	E(14)	P(14)	A(12) V(1)T(1)	H(6)R(5) K(3)	P(14)	V(6)G(6) A(1)E(1)	D(7)E(6) G(1)	E(8)G(5)	Q(13)	P(13)	Q(10)H(3)	A(13)	E(13)							

3B 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3B3	G(14)	P(14)	Y(14)	E(14)	G(14)	P(14)	V(14)	K(14)	K(14)	P(14)	V(14)	A(14)	L(14)	K(14)	V(14)	K(14)	A(13)V(1)	K(10)R(4)	N(13)H(1)	L(14)
	21	22	23	24																
3B3	I(14)	V(14)	T(14)	E(14)																

3D 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3D	G(14)	L(14)	I(14)	V(13)I(1)	D(14)	T(14)	R(14)	D(14)	V(14)	E(14)	E(14)	R(14)	V(14)	H(14)	V(14)	M(14)	R(14)	K(14)	T(14)	K(14)
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
3D	L(14)	A(14)	P(14)	T(14)	V(14)	A(14)	H(14)	G(14)	V(14)	F(14)	N(14)	P(14)	E(12)D(2)	Y(10)F(4)	G(14)	P(14)	A(14)	A(12)V(2)	L(14)	S(14)
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
3D	N(14)	K(14)	D(14)	P(14)	R(14)	L(14)	N(13)D(1)	E(14)	G(14)	V(14)	V(14)	L(14)	D(14)	E(14)	V(14)	I(14)	F(14)	S(14)	K(14)	H(14)
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
3D	K(14)	G(14)	D(14)	T(14)	K(13)R(1)	M(14)	S(10)T(4)	P(10)E(4)	E(14)	D(14)	K(14)	A(9)N(2) K(2)V(1)	L(14)	F(14)	R(14)	R(14)	C(14)	A(14)	A(14)	D(14)
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
3D	Y(14)	A(14)	S(14)	R(14)	L(14)	H(14)	S(10)G(4)	V(13)A(1)	L(14)	G(14)	T(11)I(1) L(1)M(1)	A(14)	N(14)	A(11)T(3)	P(14)	L(14)	S(14)	I(12)V(2)	Y(14)	E(14)
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
3D	A(14)	I(14)	K(14)	G(14)	V(10)I(4)	D(14)	G(14)	L(14)	D(14)	A(14)	M(14)	E(14)	P(13)S(1)	D(14)	T(14)	A(14)	P(14)	G(14)	L(14)	P(14)
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
3D	W(14)	A(14)	L(14)	Q(14)	G(14)	K(14)	R(14)	R(14)	G(14)	A(14)	L(14)	I(13)V(1)	D(14)	F(14)	E(14)	N(14)	G(14)	T(13)A(1)	V(14)	G(14)
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
3D	P(14)	E(14)	V(13)I(1)	Q(10)E(4)	A(14)	A(14)	L(14)	E(12)K(2)	L(14)	M(9)I(5)	E(13)G(1)	K(14)	R(14)	E(14)	Y(14)	K(14)	F(14)	A(9)V(5)	C(14)	Q(14)
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
3D	T(14)	F(14)	L(14)	K(14)	D(14)	E(14)	I(14)	R(14)	P(14)	M(14)	E(14)	K(14)	V(14)	R(14)	A(14)	G(14)	K(14)	T(14)	R(14)	I(14)
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
3D	V(14)	D(14)	V(14)	L(14)	P(14)	V(14)	E(14)	H(14)	I(14)	L(11)I(3)	Y(14)	T(14)	R(14)	M(14)	M(14)	I(14)	G(14)	R(14)	F(14)	C(14)
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
3D	A(14)	Q(14)	M(14)	H(14)	S(14)	N(14)	N(14)	G(14)	P(14)	Q(14)	I(14)	G(14)	S(14)	A(14)	V(14)	G(14)	C(14)	N(14)	P(14)	D(14)
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
3D	V(14)	D(14)	W(14)	Q(14)	R(14)	F(14)	G(14)	T(14)	H(14)	F(14)	A(14)	Q(14)	Y(14)	R(14)	N(14)	V(14)	W(14)	D(14)	V(14)	D(14)
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
3D	Y(14)	S(13)T(1)	A(14)	F(14)	D(14)	A(14)	N(14)	H(14)	C(14)	S(14)	D(14)	A(13)T(1)	M(14)	N(14)	I(14)	M(14)	F(14)	E(14)	E(14)	V(14)
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
3D	F(14)	R(13)H(1)	T(14)	D(10)E(4)	F(14)	G(14)	F(14)	H(14)	P(14)	N(14)	A(14)	E(14)	W(14)	I(13)V(1)	L(14)	K(14)	T(14)	L(14)	V(14)	N(14)
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
3D	T(14)	E(14)	H(14)	A(14)	Y(14)	E(14)	N(14)	K(14)	R(14)	I(14)	T(13)S(1)	V(14)	E(14)	G(14)	G(14)	M(14)	P(14)	S(14)	G(14)	C(14)
	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
3D	S(14)	A(14)	T(14)	S(14)	I(14)	I(14)	N(14)	T(14)	I(14)	L(14)	N(14)	N(14)	I(14)	Y(14)	V(14)	L(14)	Y(14)	A(14)	L(14)	R(14)
	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
3D	R(14)	H(14)	Y(14)	E(14)	G(14)	V(14)	E(14)	L(14)	D(14)	T(13)I(1)	Y(14)	T(14)	M(14)	I(14)	S(14)	Y(14)	G(14)	D(14)	D(14)	I(14)
	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
3D	V(14)	V(14)	A(14)	S(14)	D(14)	Y(14)	D(14)	L(14)	D(14)	F(14)	E(14)	A(14)	L(14)	K(14)	P(14)	H(14)	F(14)	K(14)	S(14)	L(14)
	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
3D	G(14)	Q(14)	T(14)	I(14)	T(14)	P(14)	A(14)	D(14)	K(14)	S(14)	D(14)	K(14)	G(14)	F(14)	V(13)A(1)	L(14)	G(14)	H(14)	S(14)	I(14)
	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
3D	T(12)A(2)	D(14)	V(14)	T(14)	F(14)	L(14)	K(14)	R(14)	H(14)	F(14)	H(14)	M(14)	D(14)	Y(14)	G(14)	T(14)	G(14)	F(14)	Y(14)	K(14)
	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
3D	P(14)	V(14)	M(14)	A(14)	S(14)	K(13)R(1)	T(14)	L(14)	E(14)	A(14)	I(14)	L(14)	S(14)	F(14)	A(14)	R(14)	R(14)	G(14)	T(14)	I(14)
	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
3D	Q(14)	E(14)	K(14)	L(14)	I(11)T(3)	S(14)	V(14)	A(14)	G(14)	L(14)	A(14)	V(14)	H(14)	S(14)	G(14)	P(14)	D(14)	E(14)	Y(14)	R(14)
	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
3D	R(14)	L(14)	F(14)	E(14)	P(14)	F(14)	Q(14)	G(14)	L(14)	F(14)	E(14)	I(14)	P(14)	S(14)	Y(14)	R(14)	S(14)	L(14)	Y(14)	L(14)
	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470										
3D	R(14)	W(14)	V(14)	N(14)	A(14)	V(14)	C(14)	G(14)	D(12)E(2)	A(14)										

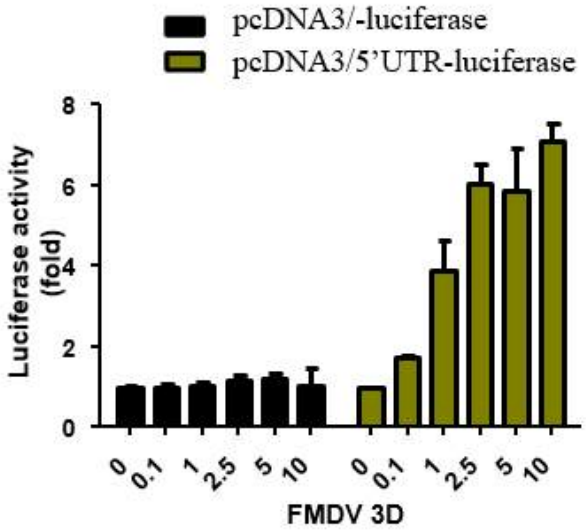


그림 9. 구제역바이러스 3D polymerase에 의한 FMDV 5'UTR RNA 합성 능력 분석

- 구제역바이러스의 in vitro RNA replication 분석을 정량화하기 위하여 본 과제에서 새롭게 제작한 FMDV 5'UTR-luciferase 레포터 시스템을 활용하여 구제역바이러스 3D polymerase의 활성을 조사하였음. 3D polymerase의 돼지세포내 발현양에 비례하여 FMDV 5' UTR 의존적인 RNA 합성 능력이 증가하였음 (그림 9).

③ 바이러스 단백질 합성능력 : 구제역바이러스 재생산을 위해서 바이러스 게놈을 둘러싸는 입 자 단백질의 합성이 필요 - **분석 대상은 IRES RNA, 2A / 3C 단백질**

- IRES 염기서열 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
IRES	G(13)A(1)	G(12)A(2)	T(10)C(4)	T(13)C(1)	C(9)T(5)	C(14)	C(14)	A(12)G(2)	C(14)	A(14)	A(14)	C(14)	C(8)T(6)	G(12)A(2)	A(14)	C(14)	A(14)	C(14)	A(10)G(4)	A(13)G(1)
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
IRES	A(14)	A(8)C(6)	G(1)	C(14)	G(14)	T(14)	G(14)	C(14)	A(14)	A(14)	C(8)T(6)	T(13)G(1)	T(14)	G(14)	A(13)G(1)	A(14)	A(10)G(4)	T(10)C(4)	C(12)T(2)	C(14)
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
IRES	C(14)	G(14)	C(14)	C(14)	T(14)	G(14)	G(14)	T(14)	C(14)	T(13)A(1)	T(14)	T(14)	C(14)	C(14)	A(14)	G(14)	G(14)	T(14)	C(14)	T(14)
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
IRES	A(14)	G(14)	A(14)	G(14)	G(14)	G(14)	G(14)	T(11)C(2) A(1)	G(10)A(4)	A(14)	C(14)	A(14)	C(11)T(3)	T(14)	T(14)	T(14)	G(14)	T(14)	A(14)	C(14)
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
IRES	T(14)	G(14)	T(14)	G(14)	A(6)T(4) G(3)C(1)	T(13)C(1)	T(14)	G(14)	A(14)	C(14)	T(14)	C(14)	C(14)	A(14)	C(14)	G(14)	C(14)	T(14)	C(14)	G(14)
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
IRES	G(14)	C(8)T(6)	C(14)	C(14)	A(12)G(2)	C(14)	T(14)	G(10)A(4)	G(14)	C(14)	G(14)	A(10)G(4)	G(14)	T(14)	G(14)	T(14)	T(12)G(2)	A(14)	G(14)	T(14)
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
IRES	A(14)	G(10)A(4)	T(9)C(5)	A(9)G(5)	G(14)	T(7)T(7)	A(14)	C(14)	T(14)	G(14)	T(14)	T(14)	G(14)	C(9)T(5)	T(14)	T(14)	C(14)	G(14)	T(12)C(2)	A(14)
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
IRES	G(14)	C(14)	G(14)	G(14)	A(14)	G(14)	C(14)	A(14)	T(14)	G(14)	G(9)A(5)	T(13)C(1)	G(14)	G(14)	C(14)	C(14)	G(14)	C(8)T(6)	G(14)	G(14)
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
IRES	G(14)	A(14)	C(9)A(5)	T(7)T(7)	C(12)T(2)	C(14)	C(14)	T(10)C(4)	C(14)	C(14)	T(14)	T(14)	G(14)	G(14)	T(14)	A(9)G(5)	A(14)	C(14)	A(14)	A(14)
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
IRES	G(14)	G(14)	A(13)G(1)	C(14)	C(14)	C(14)	A(7)A(7)	C(14)	G(14)	G(14)	G(14)	G(14)	C(14)	C(14)	G(13)A(1)	A(14)	A(14)	A(14)	G(14)	C(14)
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
IRES	C(14)	A(14)	C(14)	G(14)	T(14)	C(14)	T(13)C(1)	T(7)T(7)	A(11)T(2) G(1)	A(4)C(1)	C(4)	G(12)	G(14)	A(14)	C(14)	C(14)	C(14)	A(13)G(1)	C(9)T(5)	C(14)
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
IRES	A(14)	T(14)	G(14)	T(14)	G(14)	T(14)	G(14)	C(14)	A(14)	A(14)	C(14)	C(14)	C(14)	C(14)	A(14)	G(14)	C(14)	A(14)	C(14)	G(14)

	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
IRES	G(14)	C(13)T(1)	A(14)	A(14)	C(14)	T(10)C(4)	T(14)	T(14)	A(13)G(1)	C(14)	T(7)T(7)	A(9)G(4)T(1)	C(10)T(4)	G(14)	A(14)	A(14)	A(14)	A(13)C(1)	C(14)	C(14)

	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
IRES	A(14)	C(14)	T(14)	T(14)	T(10)C(3)A(1)	A(14)	A(14)	G(12)A(2)	G(14)	T(14)	G(14)	A(14)	C(14)	A(14)	C(14)	T(14)	G(14)	A(14)	A(7)A(7)	A(14)

	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
IRES	C(14)	T(14)	G(14)	G(14)	T(14)	A(14)	C(14)	T(14)	C(14)	A(14)	A(13)G(1)	C(13)T(1)	C(14)	A(14)	C(14)	T(14)	G(14)	G(14)	T(14)	G(14)

	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
IRES	A(14)	C(14)	A(12)G(2)	G(14)	G(14)	C(13)T(1)	T(14)	A(14)	A(14)	G(14)	G(14)	A(14)	T(14)	G(14)	C(14)	C(14)	C(14)	T(14)	T(14)	C(14)

	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
IRES	A(14)	G(14)	G(14)	T(14)	A(14)	C(14)	C(14)	C(14)	C(14)	G(14)	A(14)	G(14)	G(14)	T(14)	A(14)	A(14)	C(14)	A(14)	C(9)A(5)	G(13)A(1)

	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
IRES	C(10)T(4)	G(14)	A(14)	C(14)	A(14)	C(14)	T(14)	C(14)	G(8)A(6)	G(14)	G(14)	A(14)	T(14)	C(14)	T(14)	G(14)	A(14)	G(14)	A(14)	A(14)

	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
IRES	G(14)	G(14)	G(14)	G(14)	A(14)	T(7)T(7)	T(10)A(4)	G(14)	G(14)	G(14)	G(14)	C(14)	T(14)	T(14)	C(14)	T(14)	G(8)T(4)A(2)	T(14)	A(14)	A(14)

	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
IRES	A(14)	A(14)	G(14)	C(14)	G(14)	C(14)	C(10)T(4)	C(14)	A(10)T(4)	G(14)	T(14)	T(14)	T(14)	A(14)	A(14)	A(14)	A(14)	A(14)	G(14)	C(14)

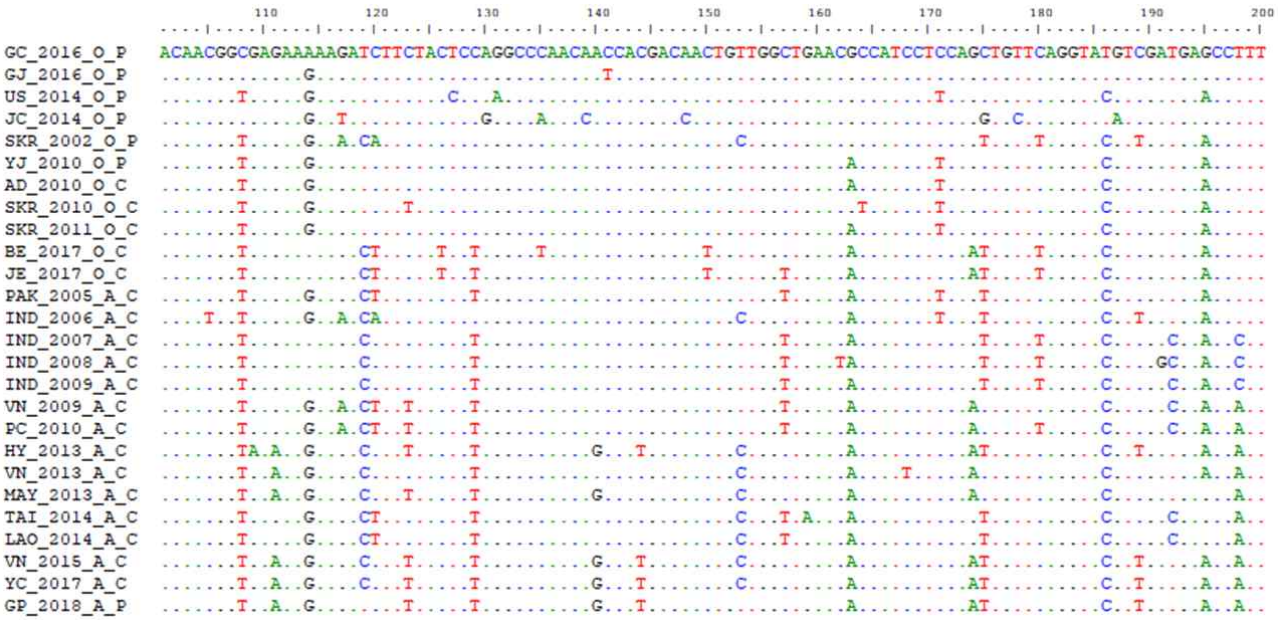
	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
IRES	T(14)	T(14)	C(14)	T(14)	A(14)	T(14)	G(14)	C(14)	C(14)	T(14)	G(14)	A(13)G(1)	A(14)	T(14)	A(14)	G(14)	G(14)	C(14)	G(14)	A(14)

	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
IRES	C(13)T(1)	C(14)	G(14)	G(14)	A(14)	G(14)	G(14)	C(14)	C(14)	G(14)	G(14)	C(14)	G(14)	C(14)	C(14)	T(14)	T(14)	T(14)	C(10)T(4)	C(14)

	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
IRES	C(4)	C(3)	A(4)	C(4)	T(11)C(3)	T(10)A(4)	A(12)G(2)	A(11)T(2)	C(11)T(2)	T(9)C(4)	A(14)	T(7)T(7)	C(12)T(2)	A(14)	C(12)T(2)	T(12)C(2)	G(9)A(5)	C(11)A(3)	T(10)C(4)	T(13)G(1)

	461
IRES	A(10)T(4)

- IRES RNA nucletodies의 변이 서열 비교만으로도 지역별과 시기별 구제역바이러스의 상호관련성을 추적분석할 수 있으며, 유전자 변이 패턴은 CRE RNA 변이 양상과 매우 유사하였음 (그림 10).



210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GC_2016_O_P CTTCGACTGGGTGTATGAATCATCTGAAAACCTCACCCTTGAGGCGATCAGACAACTGGAGAACATTACTGGTTTTGAGTTGCACGAGGGTGGCCCGCCC
GJ_2016_O_P
US_2014_O_P
JC_2014_O_P
SKR_2002_O_P
YJ_2010_O_P
AD_2010_O_C
SKR_2010_O_C
SKR_2011_O_C
BE_2017_O_C
JE_2017_O_C
PAK_2005_A_C
IND_2006_A_C
IND_2007_A_C
IND_2008_A_C
IND_2009_A_C
VN_2009_A_C
PC_2010_A_C
HY_2013_A_C
VN_2013_A_C
MAY_2013_A_C
TAI_2014_A_C
LAO_2014_A_C
VN_2015_A_C
YC_2017_A_C
GP_2018_A_P
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
GC_2016_O_P GCCCTCGTTATTTGGAACATCAAACACTTGCTTCACACTGGGATCGGCACCGCCTCGCGACCCAGCGAGGTGTGCATGGTGGACGGTACGGACATGTGCC
GJ_2016_O_P
US_2014_O_P
JC_2014_O_P
SKR_2002_O_P
YJ_2010_O_P
AD_2010_O_C
SKR_2010_O_C
SKR_2011_O_C
BE_2017_O_C
JE_2017_O_C
PAK_2005_A_C
IND_2006_A_C
IND_2007_A_C
IND_2008_A_C
IND_2009_A_C
VN_2009_A_C
PC_2010_A_C
HY_2013_A_C
VN_2013_A_C
MAY_2013_A_C
TAI_2014_A_C
LAO_2014_A_C
VN_2015_A_C
YC_2017_A_C
GP_2018_A_P
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
GC_2016_O_P TGGCAGACTTCCACGCTGGCATCTTCCTGAAAGGACAGGAACACGCCGTGTTTGCCTGCGTCACCTCTAACGGGTGGTACGCGATCGATGACGAAGAGTT
GJ_2016_O_P
US_2014_O_P
JC_2014_O_P
SKR_2002_O_P
YJ_2010_O_P
AD_2010_O_C
SKR_2010_O_C
SKR_2011_O_C
BE_2017_O_C
JE_2017_O_C
PAK_2005_A_C
IND_2006_A_C
IND_2007_A_C
IND_2008_A_C
IND_2009_A_C
VN_2009_A_C
PC_2010_A_C
HY_2013_A_C
VN_2013_A_C
MAY_2013_A_C
TAI_2014_A_C
LAO_2014_A_C
VN_2015_A_C
YC_2017_A_C
GP_2018_A_P

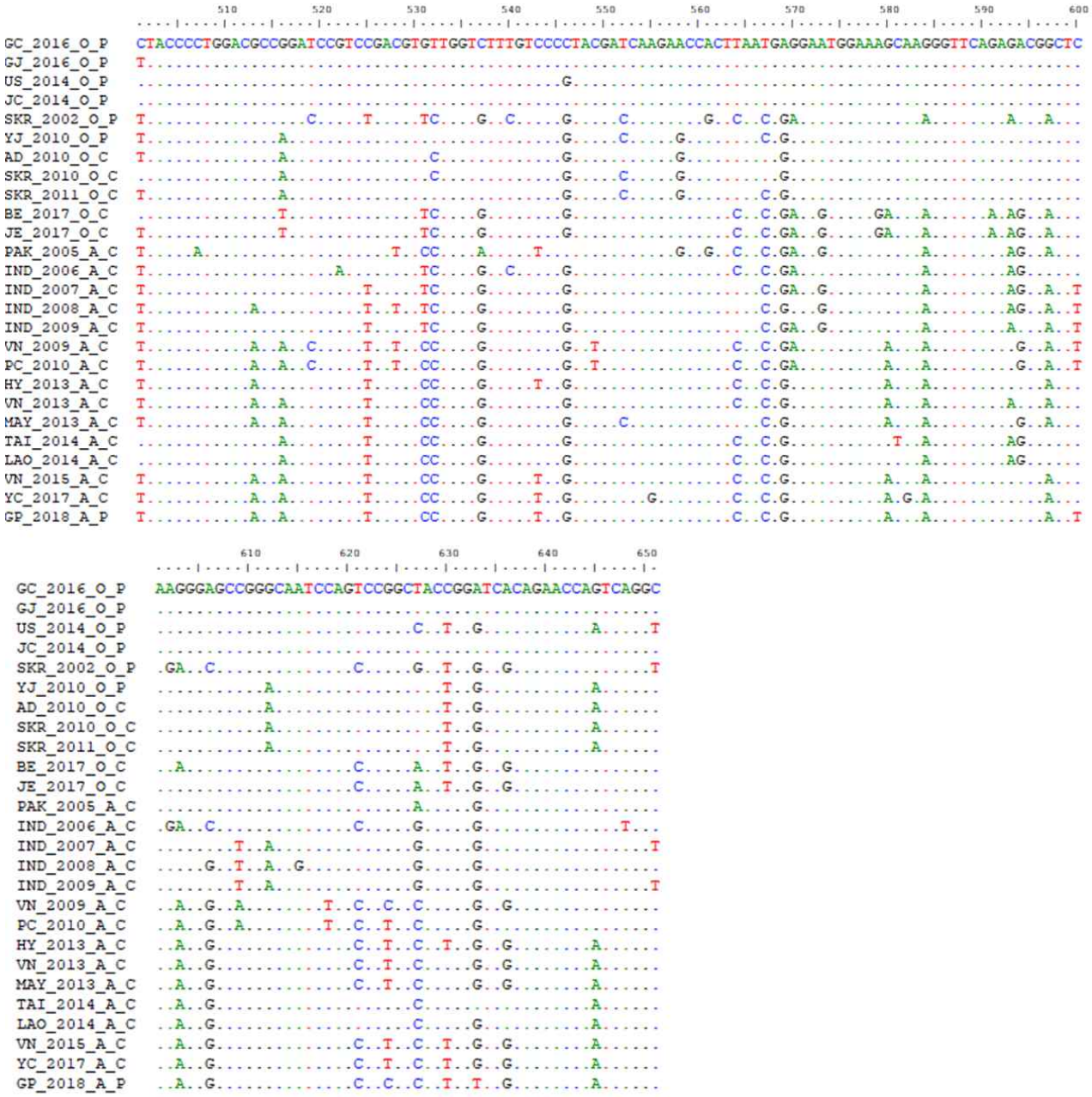


그림 10. 국내외 FMDV IRES nucleotide 서열 비교 분석

- IRES 161개의 RNA nucleotides로 구성되어있고 CRE와 똑같이 독특한 RNA 2차 구조를 가지고 있으며, 특정 2차 구조는 구제역바이러스와 숙주세포의 단백질 합성 관련 단백질들이 IRES RNA에 결합하는 플랫폼 역할을 함. IRES RNA의 염기서열 변이는 이러한 RNA 2차 구조의 변형을 가져오고 단백질 합성 조절 단백질들의 결합과 복제 효율에도 영향을 가지게 됨

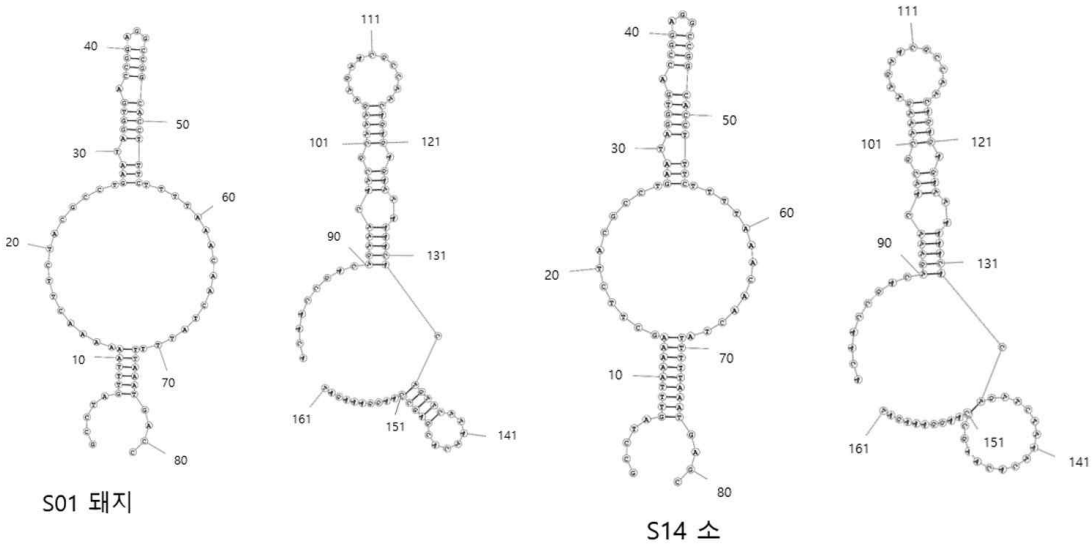


그림 11. 2002년 국내 발생 구제역바이러스의 소와 돼지의 IRES RNA 2차구조 분석

- IRES RNA 2차구조의 주요 차이점은 기본 모형은 유사하지만, circle을 구성한 RNA nucleotides 개수의 차이가 있었음. 돼지 감염에서 발견된 구제역바이러스의 IRES RNA의 circle이 소 감염 구제역바이러스 IRES 보다 3개의 RNA nucleotides을 더 가지고 있음 (그림 11).

- 2A 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2A	N(14)	F(13)L(1)	D(13)E(1)	L(14)	L(14)	K(14)	L(14)	A(14)	G(14)	D(14)	V(13)I(1)	E(14)	S(14)	N(14)	P(14)	G(14)

- 3C 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3C	S(14)	G(14)	A(14)	P(14)	P(14)	T(14)	D(14)	L(14)	Q(14)	K(14)	M(14)	V(14)	M(14)	G(14)	N(14)	T(14)	K(14)	P(14)	V(14)	E(14)

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
3C	L(14)	I(14)	L(14)	D(14)	G(14)	K(14)	T(14)	V(14)	A(14)	I(14)	C(14)	C(14)	A(14)	T(14)	G(14)	V(14)	F(14)	G(14)	T(14)	A(14)

	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
3C	Y(14)	L(14)	V(14)	P(14)	R(14)	H(14)	L(14)	F(14)	A(14)	E(14)	K(14)	Y(14)	D(14)	K(14)	I(14)	M(14)	L(14)	D(14)	G(14)	R(14)

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
3C	A(12)T(2)	M(14)	T(12)I(1)K(1)	D(14)	S(14)	D(14)	Y(14)	R(14)	V(14)	F(14)	E(14)	F(14)	E(14)	I(13)V(1)	K(14)	V(14)	K(14)	G(14)	Q(14)	D(14)

	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
3C	M(14)	L(14)	S(14)	D(14)	A(14)	A(14)	L(14)	M(14)	V(14)	L(14)	H(14)	R(14)	G(14)	N(14)	R(14)	V(14)	R(14)	D(14)	I(14)	T(14)

	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
3C	K(14)	H(14)	F(14)	R(14)	D(14)	T(9)V(4)A(1)	A(14)	R(14)	M(14)	K(14)	K(14)	G(14)	T(13)N(1)	P(13)S(1)	V(12)I(2)	V(14)	G(14)	V(14)	I(14)	N(14)

	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
3C	N(14)	A(14)	D(14)	V(14)	G(14)	R(14)	L(14)	I(14)	F(14)	S(14)	G(14)	E(14)	A(14)	L(14)	T(14)	Y(14)	K(14)	D(14)	I(14)	V(14)

	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
3C	V(14)	C(14)	M(14)	D(14)	G(14)	D(14)	T(14)	M(14)	P(14)	G(14)	L(14)	F(14)	A(14)	Y(14)	K(13)R(1)	A(14)	A(14)	T(14)	K(14)	A(14)

	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
3C	G(14)	Y(14)	C(14)	G(14)	G(14)	A(14)	V(14)	L(14)	A(14)	K(14)	D(14)	G(14)	A(14)	D(10)E(4)	T(14)	F(14)	I(14)	V(13)L(1)	G(14)	T(14)

	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
3C	H(13)	S(14)	A(14)	G(14)	G(14)	N(14)	G(14)	V(14)	G(14)	Y(14)	C(14)	S(14)	C(14)	V(14)	S(14)	R(14)	S(14)	M(14)	L(14)	L(7)Q(7)

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
3C	K(14)	M(14)	K(14)	A(14)	H(14)	I(14)	D(14)	P(14)	E(14)	P(14)	H(14)	H(14)	E(14)

- FMDV 3C 단백질의 숙주세포 내에서의 기능은 다음과 같음
  - ♦ chymotrypsin-like cysteine protease의 기능을 가지며 대부분의 구제역바이러스 단백질들의 절단에 의한 활성 단백질들의 생성을 담당
  - ♦ Q-G, E-G, Q-L, E-S 등을 절단 (poliovirus와 같은 다른 picornavirus의 $3C^{pro}$는 Q-G만 cleavage)
  - ♦ eIF4A(cap-binding complex의 RNA helicase)와 eIF4G(L^{pro}보다 뒤쪽 자리를 절단) 숙주세포의 단백질 합성인자들을 절단하여 숙주세포의 정상적인 기능을 저해
  - ♦ 3CD 형태로 핵 내로 이동($3D^{pol}$의 N-말단에 핵내 이동 아미노산 서열이 존재)하며 Sam68 (68 kDa Src-associated substrate during mitosis)의 C-말단의 핵내 이동 아미노산 서열을 포함하는 18kDa 부분을 잘라냄. 남은 Sam68(~50kDa)은 세포질에 위치하여 단백질 합성 조절 영역인 IRES와 결합하여 바이러스 RNA의 단백질 합성을 촉진
  - ♦ 자연 면역계를 조절함. NEMO(nuclear transcription factor kappa B(NF-κB) essential modulator, bridging adaptor protein으로 NF-κB, IFN-조절인자 신호전달경로 활성화에 필수적)을 절단하여 RIG-I/MDA5 신호전달 활성화를 감소
  - ♦ TATA-box binding protein, octamer-binding protein, p53, cyclic AMP-responsive element binding protein, DNA polymerse III 등을 절단하여 숙주세포의 전사와 번역을 전반적으로 교란시킴

- 3C 단백질의 protease 기능이 구제역바이러스 전체 개별 단백질의 생성에 필수적이기 때문에 바이러스 전파에 매우 중요한 역할을 수행함. 3C 변이 단백질들의 protease 기능 변화를 추적하기 위하여 in vitro에서 3C 변이 단백질들을 제작하였음

✓ **Expression 확인**

- IPTG induction: 0.1mM, 18°C, 100rpm, O/N
- 10μl protein loading

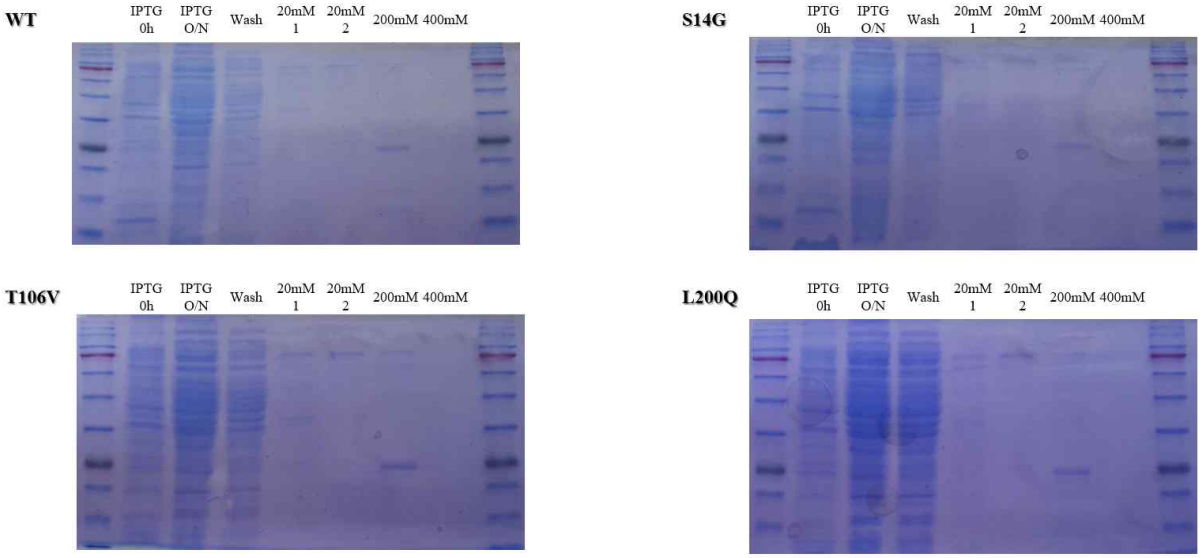


그림 12. FMDV 변이주의 3C 변이단백질 제조와 분리

- FMDV 3C protease 단백질을 His-tag 3C 형태의 단백질로 순수 분리하였음. 3C 단백질은 가장 변이가 적은 WT과 함께 S14G, T106V, L200Q 변이 단백질을 제작 분리하였으며, protease 기능 변화 분석을 위한 실험에 활용하였음 (그림 12).

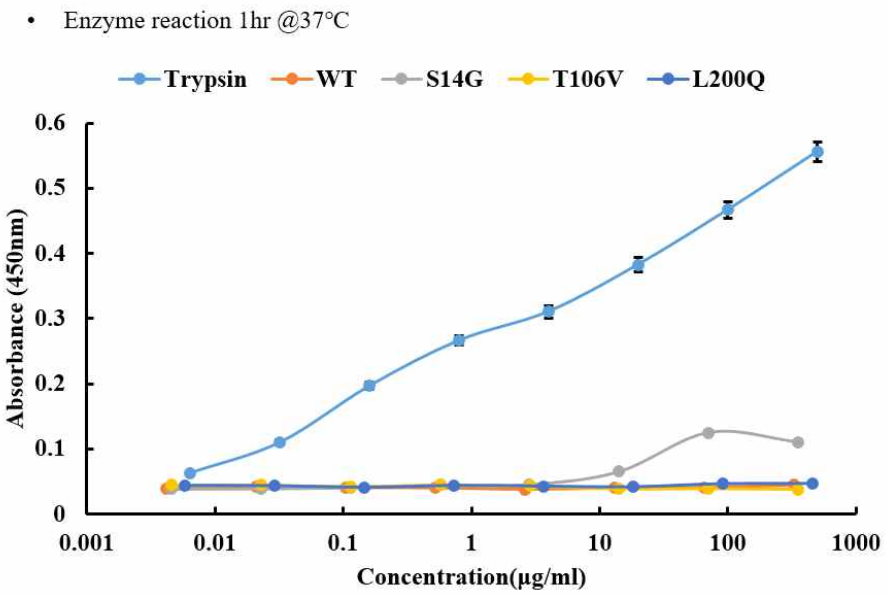


그림 13. FMDV 3C 변이단백질들의 protease 활성 비교 분석

- 4개의 3C 변이 단백질들을 제작 분리하여 protease 활성 비교 분석 실험을 수행하였음. control로 사용한 trypsin은 농도 의존적으로 아주 큰 protease 활성을 보였으며, 4개의 3C 변이 단백질들 중에서 S14G 3C 단백질이 가장 큰 protease 활성을 보였음 (그림 13).

- Cell: IBRS-2 5*10^4 cells/well in 24well plate
- Gene: pcDNA3/5'UTR-Luc 100ng

  pcDNA3-HA/3C (WT, S14G, T106V, L200Q)

  pcDNA3-HA 50ng
- Transfection reagent: jetPEI 1μl

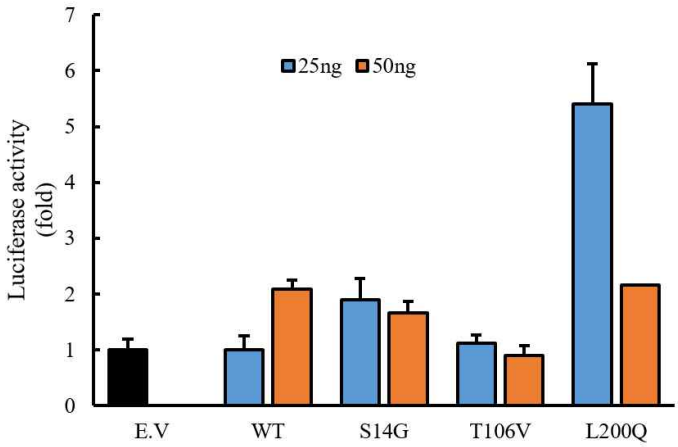


그림 14. FMDV 3C 변이단백질들의 FMDV 5'UTR 전사활성에의 영향 분석

- 3C 변이 단백질들의 구제역바이러스 RNA 전사 활성에의 영향을 분석하였음. protease 활성의 결과와 비례하여 WT 3C 단백질 보다 S14G 3C 변이 단백질의 FMDV 5'UTR 레포터 시스템의 전사 활성이 높았음. 하지만 L200Q 3C 변이 단백질이 가장 큰 전사 활성이 강하였음 (그림 14).

- 결론으로, 3C 유전자는 S14G와 L200Q의 변이가 보다 구제역바이러스의 단백질 합성이 증가할 수 있고 전파력도 강하게 할 수 있음을 제시함

④ 바이러스 입자 형성 : 전파를 위한 구제역바이러스 입자에 필요한 VP1, VP2, VP3, VP4의 구조단백질들의 합성이 필요 - **분석 대상은 2C**

- 2C 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2C	L(14)	K(14)	A(14)	R(14)	D(14)	I(14)	N(14)	D(14)	I(14)	F(14)	A(14)	I(14)	L(14)	K(14)	N(14)	G(14)	E(14)	W(14)	L(14)	V(14)
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
2C	K(14)	L(14)	I(14)	L(14)	A(14)	I(14)	R(14)	D(14)	W(14)	I(14)	K(14)	A(14)	W(14)	I(13)V(1)	A(14)	S(14)	E(14)	E(14)	K(14)	F(14)
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
2C	V(14)	T(14)	M(12) V(1)T(1)	T(14)	D(14)	L(14)	V(14)	P(14)	G(13)S(1)	I(14)	L(14)	E(14)	K(14)	Q(14)	R(13)Q(1)	D(14)	L(14)	N(14)	D(14)	P(14)
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
2C	A(7)S(7)	K(11)R(3)	Y(14)	K(12)E(2)	E(12) A(1)G(1)	A(14)	K(14)	E(14)	W(14)	L(14)	D(14)	N(10)S(4)	A(14)	R(14)	Q(14)	A(10)T(4)	C(14)	L(14)	K(14)	S(14)
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2C	G(14)	N(14)	V(14)	H(14)	I(14)	A(14)	N(14)	L(14)	C(14)	K(14)	V(14)	V(8)I(2) A(2)T(2)	A(14)	P(14)	A(14)	P(14)	S(14)	K(9)R(5)	S(13)P(1)	R(14)
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
2C	P(14)	E(14)	P(14)	V(14)	V(14)	V(14)	C(14)	L(14)	R(14)	G(14)	K(14)	S(14)	G(14)	Q(14)	G(14)	K(14)	S(14)	F(14)	L(14)	A(14)
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
2C	N(14)	V(14)	L(14)	A(14)	Q(14)	A(14)	I(14)	S(14)	T(14)	H(14)	F(12)Y(2)	T(14)	G(14)	R(14)	T(13)I(1)	D(14)	S(14)	V(14)	W(14)	Y(14)
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
2C	C(14)	P(14)	P(14)	D(14)	P(14)	D(14)	H(14)	F(14)	D(14)	G(14)	Y(14)	N(14)	Q(14)	Q(14)	T(14)	V(14)	V(14)	V(14)	M(14)	D(14)
	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
2C	D(14)	L(14)	G(14)	Q(14)	N(14)	P(14)	D(14)	G(14)	K(14)	D(14)	F(14)	K(14)	Y(14)	F(14)	A(14)	Q(14)	M(14)	V(14)	S(14)	T(14)
	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
2C	T(14)	G(14)	F(14)	I(14)	P(14)	P(14)	M(14)	A(14)	S(14)	L(14)	E(14)	D(14)	K(14)	G(14)	K(14)	P(14)	F(14)	N(14)	S(14)	K(14)
	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
2C	V(14)	I(14)	I(14)	A(13)T(1)	T(14)	T(14)	N(14)	L(14)	Y(14)	S(13)A(1)	G(14)	F(14)	T(14)	P(14)	R(14)	T(14)	M(14)	V(14)	C(14)	P(14)
	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
2C	D(14)	A(14)	L(14)	N(14)	R(14)	R(14)	F(14)	H(14)	F(14)	D(14)	I(14)	D(14)	V(14)	S(14)	A(13)V(1)	K(14)	D(14)	G(14)	Y(14)	K(14)
	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
2C	I(12) V(1)T(1)	N(12)S(2)	N(13)S(1)	K(14)	L(14)	D(14)	I(14)	I(13)T(1)	K(14)	A(14)	L(14)	E(14)	D(14)	T(14)	H(14)	T(14)	N(14)	P(14)	V(14)	A(14)
	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
2C	M(14)	F(14)	Q(14)	Y(14)	D(14)	C(14)	A(14)	L(14)	L(14)	N(14)	G(14)	M(14)	A(14)	V(14)	E(14)	M(14)	K(14)	R(14)	M(13)L(1)	Q(14)
	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
2C	Q(14)	D(14)	M(13)L(1)	F(14)	K(11)T(1) N(1)R(1)	P(14)	Q(14)	P(14)	P(14)	L(13)I(1)	Q(14)	N(14)	V(7)I(5) T(1)	Y(14)	Q(14)	L(14)	V(14)	Q(14)	E(14)	V(14)

	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318
2C	I(14)	D(10)E(4)	R(14)	V(14)	E(14)	L(14)	H(14)	E(14)	K(14)	V(14)	S(14)	S(14)	H(14)	P(14)	I(14)	F(14)	K(14)	Q(14)

그림 15. 국내 발생 18종 구제역바이러스의 2C 변이 단백질 아미노산 조성 비교 분석

- 2C 단백질의 숙주세포 내 기능은 다음과 같음
  - ♦ 동·식물 상관없이 많은 RNA virus에 2C-like protein 존재하며 유전자 서열도 잘 보존되어있음
  - ♦ 318 아미노산으로 구성되며 N-말단(17-34aa)에 amphipathic helix가 존재하여 membrane targeting 역할을 하는 것으로 추측
  - ♦ 구제역바이러스 RNA 복제 복합체 형성에서 요구되는 소포체 막에 결합하는 주요 요소 작용
  - ♦ 소포체 막의 견고성과 배열에 관여하여 바이러스 복제 복합체 형성에 기능을 하며 바이러스 감염에 의한 세포손상을 유도
  - ♦ 구제역바이러스 복제에 중요한 인자로서 guanidin hydrochloride (2C의 길항제) 처리 시 바이러스 RNA 합성을 억제하며 guanidin-저항성 2C 변이체의 경우 저해 효과가 없음
  - ♦ 바이러스 증식 동안 복제 복합체에 관여하기 때문에 백신 접종 가축과 구제역 발병 가축과 구분할 때 사용
  - ♦ N-myc and STAT interacting (Nmi) 단백질과 결합하여 apoptosis를 유도하며 IFN에 의해 유도되는 35-kDa protein (IFP35)와의 결합을 통해 type I IFN 반응에 관여함이 보고됨
  - ♦ Beclin1(autophagosome 형성 개시, autophasome의 리소좀 융합 기능)와의 결합을 통해 구제역바이러스에 의해 유도되는 autophagy에 관여함. 2C-induced Beclin1 불활성화를 통하여, 구제역바이러스의 autophagosome의 융합과정을 억제하여 바이러스의 분해를 막을 수 있음

- 지금까지 FMDV 2C 단백질의 숙주세포 내에 발현될 때 세포에서 위치하는 장소를 정확하게 밝혀지지 않았음. 본 연구에서 2C 단백질은 세포소기관인 소포체에 존재함을 알 수 있었음. 그림 16의 결과에서, 적색으로 표시된 ER tracker는 소포체를 명시하고 있으며, 녹색으로 표시하는 GFP-2C 단백질 역시 소포체에 존재하는 것으로 나타났음. Merged 판넬에서 적색과 녹색이 융합하여 노란색 계통의 색이 나타나는 것으로 보아서 FMDV 2C 단백질은 숙주세포의 소포체에 선별적으로 존재함을 규명하였음

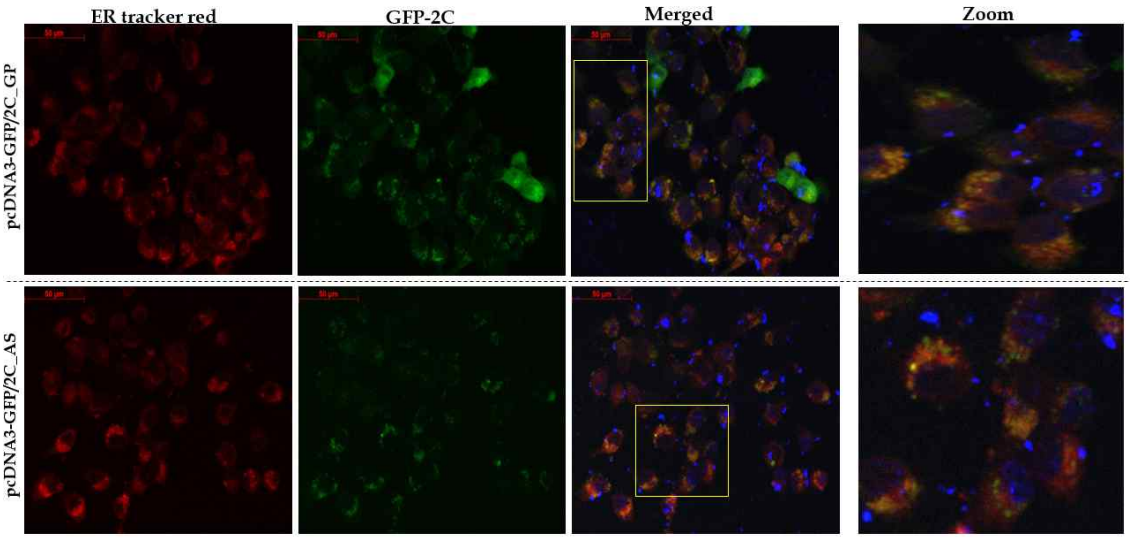


그림 16. 구제역바이러스 2C 단백질의 세포 내 위치 분석

- 2C_AS 바이러스 변이 단백질이 2C_GP 단백질 보다 더 큰 확률로 소포체에 잘 위치함을 알 수 있었음. 이는 Merged 구획에서 2C_AS 단백질의 대부분이 ER tracker와 중복됨으로써 파악할 수 있음 (그림 16).

⑤ 바이러스 입자 세포외 방출 : 재생산된 구제역바이러스 입자들을 세포외로 방출하는 과정에 관여하는 바이러스 단백질이 관여 - **분석 대상은 2B**

- 2B 단백질 아미노산 변이 정리

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2B	P(14)	F(11)L(3)	F(14)	F(14)	S(14)	D(14)	V(14)	R(14)	S(14)	N(14)	F(14)	T(10)S(4)	K(14)	L(14)	V(14)	E(14)	T(13)I(1)	I(14)	N(10)S(4)	Q(14)
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
2B	M(14)	Q(14)	E(14)	D(14)	M(14)	S(14)	T(14)	K(14)	H(14)	G(14)	P(14)	D(14)	F(14)	N(13)S(1)	R(14)	L(14)	V(14)	S(14)	A(14)	F(14)
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
2B	E(14)	E(14)	L(14)	A(14)	T(8)I(5) A(1)	G(14)	V(14)	K(14)	A(14)	I(14)	R(14)	T(11)N(3)	G(14)	L(14)	D(14)	E(14)	A(14)	K(14)	P(14)	W(14)
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
2B	Y(14)	K(14)	L(14)	I(14)	K(14)	L(14)	L(14)	S(14)	R(14)	L(14)	S(14)	C(14)	M(14)	A(14)	A(14)	V(14)	A(14)	A(14)	R(14)	S(14)
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2B	K(14)	D(14)	P(14)	V(14)	L(14)	V(14)	A(14)	I(14)	M(14)	L(14)	A(14)	D(14)	T(14)	G(14)	L(14)	E(14)	I(14)	L(14)	D(14)	S(14)
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
2B	T(14)	F(14)	V(14)	V(14)	K(14)	K(14)	I(14)	S(14)	D(14)	S(14)	L(14)	S(14)	S(14)	L(14)	F(14)	H(14)	V(14)	P(14)	A(14)	P(14)
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
2B	V(10) I(2)A(2)	F(14)	S(14)	F(14)	G(14)	A(14)	P(14)	I(10)V(4)	L(14)	L(14)	A(14)	G(14)	L(14)	V(14)	K(14)	V(14)	A(14)	S(14)	S(12) T(1)N(1)	F(14)
	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154						
2B	F(14)	R(14)	S(14)	T(14)	P(14)	E(14)	D(14)	L(14)	E(14)	R(14)	A(14)	E(14)	K(14)	Q(14)						

그림 17. 국내 발생 14종 구제역바이러스의 2B 변이 단백질 아미노산 조성 비교 분석

- 그림 17의 2B 변이 단백질 아미노산 조성을 분석하여 국내 발생 구제역에서 변이가 많이 일어나는 바이러스주의 2B 변이 단백질 발현 시스템을 제작하고 있음. 향후 2B 변이 단백질을 구제역바이러스가 감염된 숙주세포에서 인위적으로 발현시켜 바이러스 방출 정도를 분석하고자함

- 국내 발생 구제역바이러스의 유전자 변이 속도와 유전자별 변이 차이를 분석하기 위하여 endemic 상황으로 관련이 있을 것으로 추측되는 2014년과 2016년 국내 발생 구제역바이러스의 유전자 변이 상황을 비교 분석하였음 (그림 18).

Region	Mutation 개수	길이(nt)	전체 변이율(%)	연도별 변이율(%)
5′	31	600	5.17	2.58
cre	2	54	3.70	1.85
IRES	17	456	3.73	1.86
L	47	651	7.22	3.61
VP4	6	2076	0.29	0.14
VP2	33	654	5.05	2.52
VP3	31	660	4.70	2.35
VP1	33	639	5.16	2.58
2A	1	48	2.08	1.04
2B	11	462	2.38	1.19
2C	39	954	4.09	2.04
3A	19	459	4.14	2.07
VPg1	1	69	1.45	0.72
VPg2	3	72	4.17	2.08
Vpg3	2	72	2.78	1.39
3C	21	639	3.29	1.64
3D	65	1410	4.61	2.30
3′	4	148	2.70	1.35
TOTAL	366	10123	3.62	1.81

그림 18. 2014년과 2016년 국내 발생 구제역바이러스의 유전자 변이 내용

- 2014년과 2016년 국내 발생 구제역바이러스는 endemic 상태에서 서로 연관성을 가지는 것으로 추정되고 있음. 이들 2개년 FMDV의 변이수는 총 366개로서 전체 변이율은 1.81%를 보임. 일 년 동안 0.9%의 평균 183개의 유전자 변이가 발생하였음. 2일에 하나의 RNA nucleotide의 변이를 보임

- 가장 큰 변이율은 보이는 유전자는 L 유전자로서 3.61%이며, 가장 낮은 변이율은 VP4 유전자임. VP4 단백질은 VP1/VP2/VP3 단백질들과는 다르게 항상 바이러스 capsid의 내부쪽으로 향해 있기 때문에 숙주세포의 면역 감시에서 회피되어있는 이유로 유전자 변이 압력이 약한 것으로 해석됨. 특이한 것은 비구조단백질인 3D polymerase의 변이율이 2.30으로서 구조단백질인 VP1/VP2/VP3와 비슷한 것임

2) FMDV 단백질 변이체 기능 변화 분석

① FMDV VP1의 아미노산 변이체들과 소와 돼지의 integrin alpha5와의 결합 기능 변화 분석

- 국내 발생 FMDV의 주요 아미노산 변이를 함유한 VP1 변이체 단백질과 소 또는 돼지 유래 integrin alpha5 단백질 간의 결합 기능 변화를 분석하기 위하여 다양한 VP1 변이체들의 유전자를 클로닝하였음

- VP1 변이체 유전자는 2가지 종류의 단백질 발현 plasmid에 클로닝하였음

1) 숙주세포에서 VP1 단백질과 integrin alpha5 단백질 간의 결합 기능 변화를 상대적으로 확인하기 용이한 mammalian two-hybrid assay에 이용하기 위한 클로닝
2) in vitro에서 protein-protein interaction을 확인하기 위해서 E. coli에서 단백질을 발현하기 위하여 His-tag된 재조합단백질 발현 plasmid로의 클로닝

- 그림 19는 숙주세포에서의 in vivo protein-protein interaction을 분석하기 위한 mammalian two-hybrid assay의 원리를 설명한 것임. pM plasmid에는 UAS라는 전사인자가 결합하는 부위에 결합하는 Gal4 DNA-binding domain 유전자가 있으며 이 뒤쪽에 VP1 변이체 유전자를 클로닝함. pVP16 plasmid에는 AD라고 표시되어있는 activation domain이 있으며 이 뒤쪽에 VP1과 결합할 수 있는 integrin alpha5 유전자를 클로닝함. 세포에서 발현된 VP1과 integrin alpha5가 직접 결합하게 되면 분리되어있던 DNA-binding domain (DNA-BD)와 activation domain (AD)가 하나로 연결되어 유전자 발현이 개시됨. 이 전사활성 신호를 전달받아서 luciferase가 발현되어 luminometer로 효소활성을 측정하는 원리임

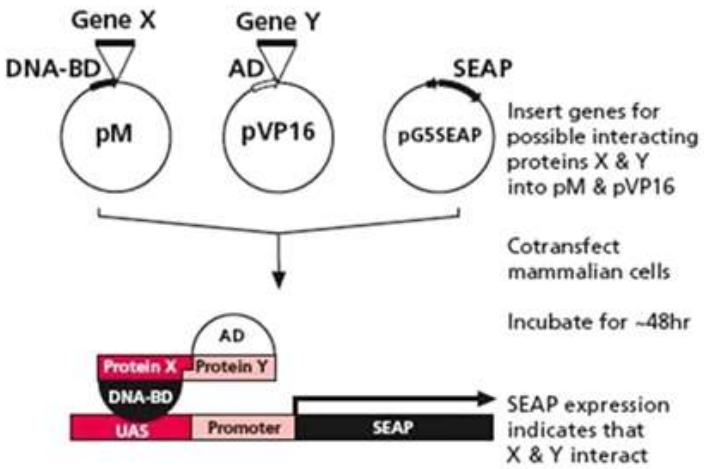


그림 19. 바이러스 단백질과 숙주세포 단백질 결합 기능 변화 분석에 이용한 mammalian two-hybrid asssay 방법

- 그림 20에서, 4가지 다른 VP1 변이체들과 소와 돼지의 2개의 다른 integrin alpha5 변이체의 단백질 결합 기능 변화를 분석하였음. O/GJ/SKR/2016/P에서 분리된 VP1은 소의 integrin 보다 돼지의 integrin에 3.5배 이상 더 잘 결합함을 알 수 있었음. 반대로 O/BE/SKR/2017/C에서 분리된 VP1은 돼지 integrin 보다 소의 integrin에 2배 이상 강하게 결합함을 보여줌. 이를 통해 소 또는 돼지에 보다 친화력이 강한 VP1 결합 부위의 특징적인 아미노산을 발굴할 수 있게 함.

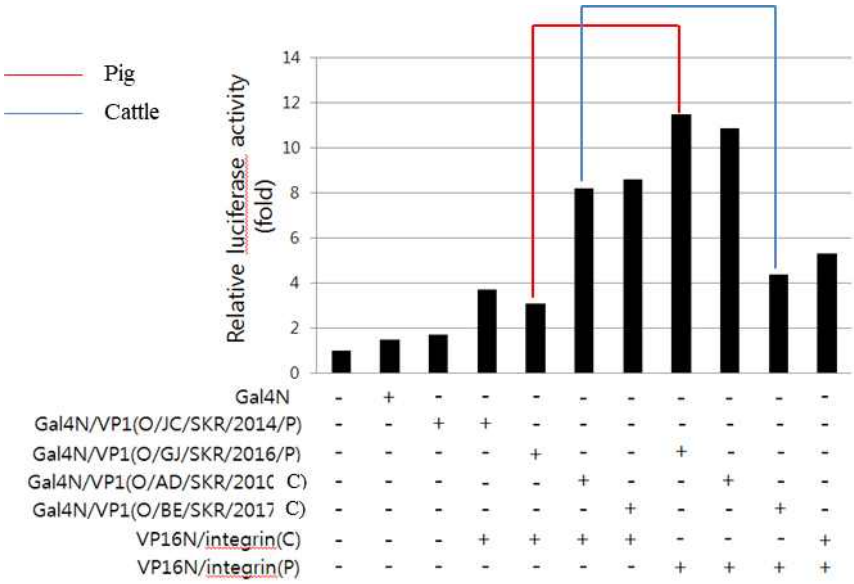


그림 20. 국내 발생 FMDV의 VP1 아미노산 변이체들과 숙주세포 integrin alpha 5 단백질의 결합 기능 변화 분석

- FMDV는 integrin (alpha 5/ beta 6) 발현이 거의 되지 않는 세포에서도 감염되는 경우가 많음. 이 경우에는 heparan sulfate가 FMDV entry 에 이용되기도 함. 또한 integrin (alpha 5/ beta 6)을 발현하고 있는 많은 세포들에게서 FMDV가 감염되지 않는 경우도 있음. 이에 따라 FMDV는 integrin (alpha 5/ beta 6) 이외에 FMDV entry에 다른 단백질들을 필요로 할 가능성이 있음. 이들 새로운 단백질들의 파악은 FMDV entry 과정에서 종특이성을 제공하는 주요 원인 인자가 될 수 있음. integrin 이외에 FMDV VP1 단백질과 결합하는 돼지 세포의 단백질 분석을 진행함

② VP1과 occludin의 상호결합

- 구제역바이러스의 세포유입은 일차적으로 숙주세포의 세포막에 노출되어있는 integrin alpha5/beta6에 의해서 시작되는 것이 알려져 있음. 하지만 구제역바이러스가 속한 picornavirus 속의 다른 바이러스들의 경우 integrin 이외에 다른 보조 단백질들이 바이러스 유입에 관여하는 것이 알려져 있음. 구제역바이러스도 integrin 수용체 단백질이 있는 세포 종류에서도 세포 유입이 잘 되지 않는 경우가 많음. intergin 단백질 이외에 구제역바이러스의 세포 유입을 조절하는 숙주세포 단백질을 탐색하였음

- occludin은 다른 돼지 감염 RNA 바이러스에서 일차적인 바이러스 수용체는 아니지만 세포유입에 필요한 단백질로 알려져 있음. 돼지 숙주세포의 막과 세포질 추출물을 이용하여 VP1과 occludin의 protein-protein interaction을 분석하였음

-

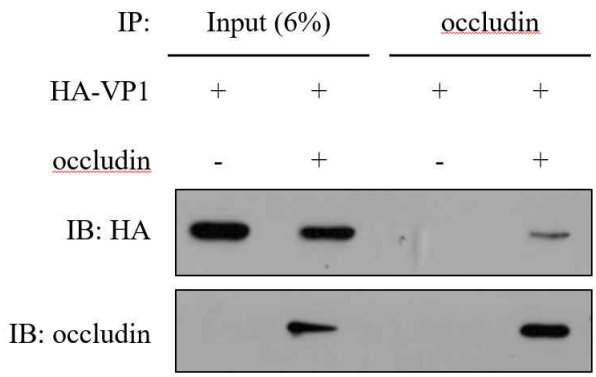


그림 21. 2010년 안동주 FMDV VP1 단백질과 결합하는 돼지세포 occludin 분석

- FMDV VP1 단백질 코딩 유전자 부위를 HA-tag 되어있는 plasmid vector에 삽입하여 HA-VP1 recombinant protein을 만들도록 유도함. 이 HA-VP1 발현 벡터를 BHK-21 세포에 형질도입 시킨 후, HA-특이 항체를 이용하여 VP1과 결합하는 세포 단백질들을 co-immunoprecipitation 방법으로 획득함 (그림 21). 약 65 kD 분자량에 해당하는 단백질 위치의 occludin 단백질을 occludin 항체을 이용하여 확인하였음. occludin 단백질은 세포의 표면 막에 위치하여 세포와 세포 사이의 연접에 관여하는 것이 알려져 있음.

- FMDV VP1은 주로 integrin alpha5/beta6 막단백질을 virus entry 대상으로 이용하는 것이 알려져 있지만 occludin이 바이러스가 세포 내부로 internalization 될 때에 요구되는 co-receptor로 기능할 가능성이 있음

그림 22. occludin DNA 염기 서열. 소(bos taurus)와 돼지(sus scrofa) 숙주 occludin 유전자 염기 변이 서열의 분석

- occludin의 유전자 서열을 소와 돼지에서 비교하였음. 이를 위하여 NCBI에서 제공하는 PubMed 프로그램에서 각각의 유전자 서열을 얻어서 nucleotide alignment를 통하여 변이 부분을 탐색하였음. 그림 22에서 보듯이, 5‘ 말단 부분 (1 ~ 15 nucleotide)와 3’ 말단 부분 (1531 ~ 1550 nucleotide) 지역은 아미노산 코드에 영향을 주지 않기에 이 부분을 이용하여 전체 유전자를 획득하는데 이용할 수 있음. 이를 통해서 단백질 발현 벡터에 클로닝함

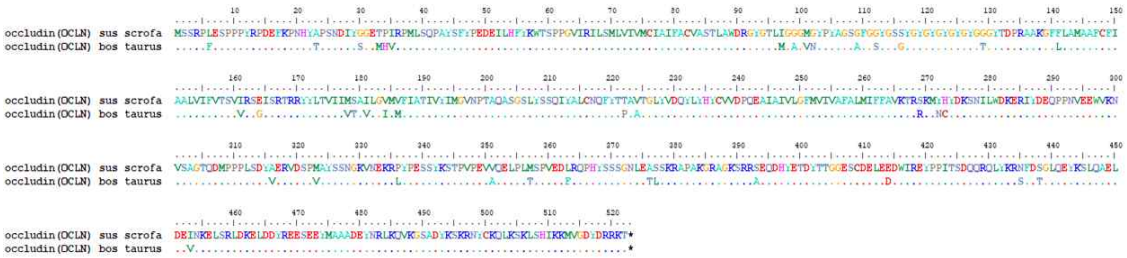


그림 23. occludin 단백질 아미노산 서열. 소(bos taurus)와 돼지(sus scrofa) 숙주 occludin 단백질 아미노산 변이 서열의 분석

- occludin 단백질은 전체 522개의 아미노산으로 구성되어있으며 약 65 kD의 분자량을 가지고 있음. 그림 23에서 보듯이, 전체 단백질 부위에서 균등하게 소와 돼지 유전자의 변이가 보이는 것이 아니라 몇 기능 부위에서 변이가 집중되어있음을 알 수 있음

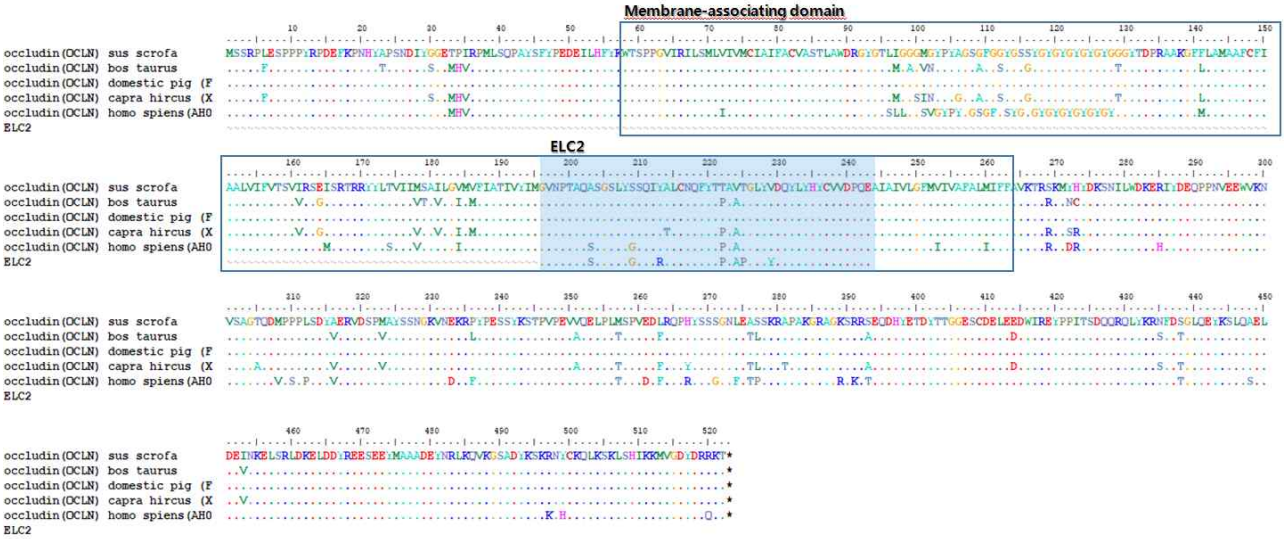


그림 24. FMDV VP1과 결합하는 occludin 단백질 부위 분석. 파란색으로 표시된 부위가 occludin의 extracellular loop 2개 중 2번째 loop에 해당함

- occludin은 세포막에 위치하면서 크게 3개의 기능 도메인으로 구성되어있음. 세포외부에 노출되어있는 extracellular domain, 세포막을 관통하고 있는 transmembrane domain, 그리고 세포내부에 위치한 intracellular domain임. extracellular domain은 2개의 extracellular loop을 가지고 있는데, 예비실험으로서 FMDV VP1은 2번째 extracellular loop에 결합하는 것으로 보임. 그림 24의 파란색으로 표시된 부분이 2번째 extracellular loop에 해당하는 지역으로서 소와 돼지 유전자를 비교하면 222번째 아미노산인 threonine과 proline이 대응하고, 224번째 아미노산은 valine과 alanine으로 다르게 구성되어있음

- 흥미로운 사실은 occludin의 아미노산 178부터 276번 까지 98개의 아미노산 부위는 소와 염소 그리고 사람에게서 유사한 아미노산을 가지지만 야생 멧돼지와 사육 돼지의 아미노산과는 뚜렷한 차이를 보임. 2번째 extracellular domain은 소와 돼지 사이에서 종특이적인 아미노산 구성을 보이고 있음

- occludin 단백질의 222/224번째 아미노산의 차이는 돼지에서만 보이는 특성임. 이 2개의 다른 아미노산은 소, 염소 그리고 사람과도 다르기 때문에 숙주특이성을 보이는 마커로 활용할 수 있음

- occludin 특이 항체를 이용하여 세포내 발현패턴을 조사하였음. 그림 25에 보듯이 occludin은 돼지세포의 세포 표면에 잘 발현되고 있음을 확인하였음.

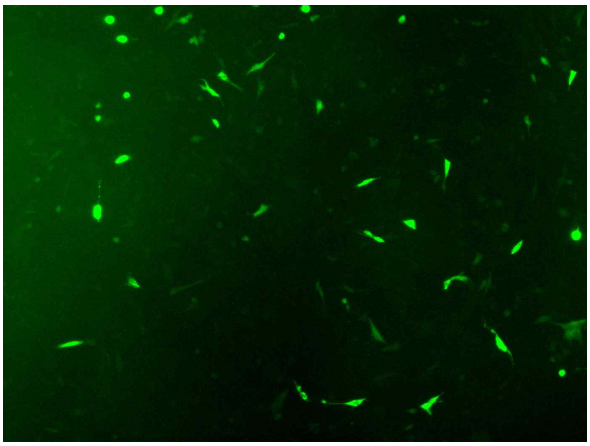


그림 25. BHK-21에서 occludin 단백질의 발현

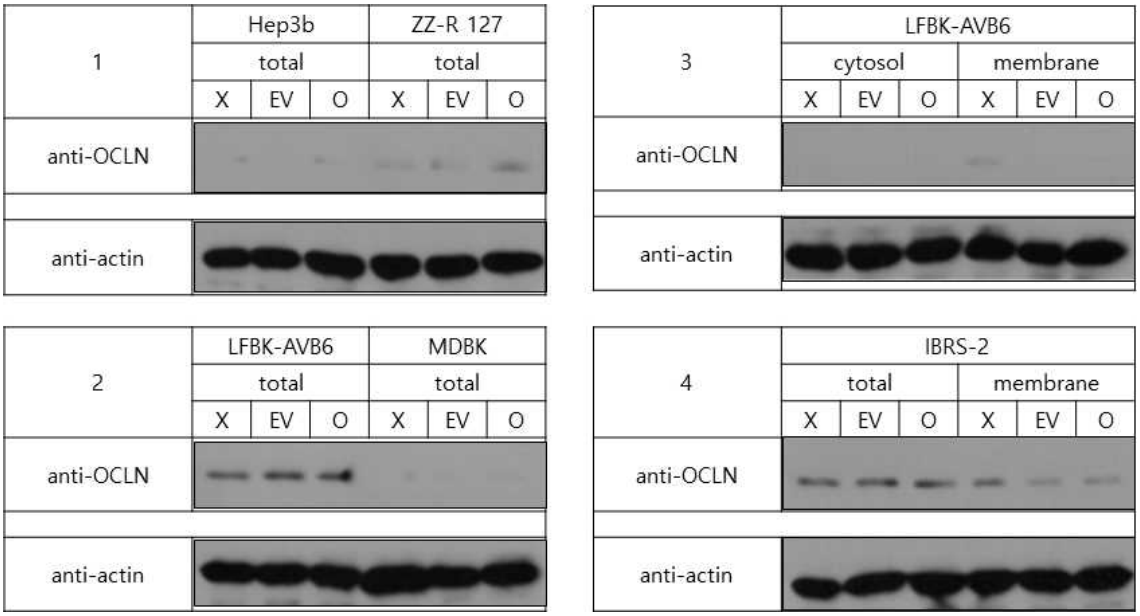


그림 26. 사람, 소, 돼지세포에서의 occludin 단백질의 발현 패턴의 분석

- occludin 단백질과 FMDV VP1 단백질의 상호결합 여부를 확인하기 위하여 우선 occludin 단백질의 발현이 많이 되는 세포 분석을 수행하였음. 그림 26에서 보듯이, 사람의 간조직 세포인 Hep3b, 염소의 혀 상피세포인 ZZ-R127, 돼지 신장세포인 LFBK-AVB6, 소 신장세포인 MDBK, 돼지 신장의 상피세포인 IBRS-2 세포들의 전체 세포추출물 또는 막분획을 이용하여 occludin 항체로 Western blot assay로 분석하였음. occludin 단백질은 돼지 세포인 LFBK-AVB6 와 IRBS-2 세포에서 많이 발현됨을 확인하였음. LFBK-AVB6 와 IRBS-2 세포들에 FMDV VP1 단백질 발현을 유도하여 protein-protein interaction 실험을 수행함

③ FMDV VP1 변이 단백질의 cellular localization

- VP1은 숙주세포막에 있는 integrin 수용체와 결합하여 구제역바이러스의 세포유입을 촉진시키는 것이 알려져있지만, 세포유입 이후에 VP1의 존재와 기능에 대해서는 많은 연구가 되어있지 않음. 몇 개의 연구보고들에서 VP1이 숙주세포의 이상과 염증반응을 유도한다는 것이 알려져 있음. 이는 VP1 단백질이 세포 내부에 들어와서 특정 기능을 수행함을 제시함

- VP1의 세포 내부의 cellular localization을 파악하기 위하여 다양한 VP1 변이유전자들을 RFP(적색 형광 유전자)에 연결한 construct를 제작하였음. 제작된 RFP-VP1 변이 단백질들을 돼지세포에 발현시킨 결과, 그림 27에서 보듯이, VP1 단백질은 돼지세포 내부에 오랜 기간 존재하며 소포체에 집중적으로 위치함을 알 수 있었음

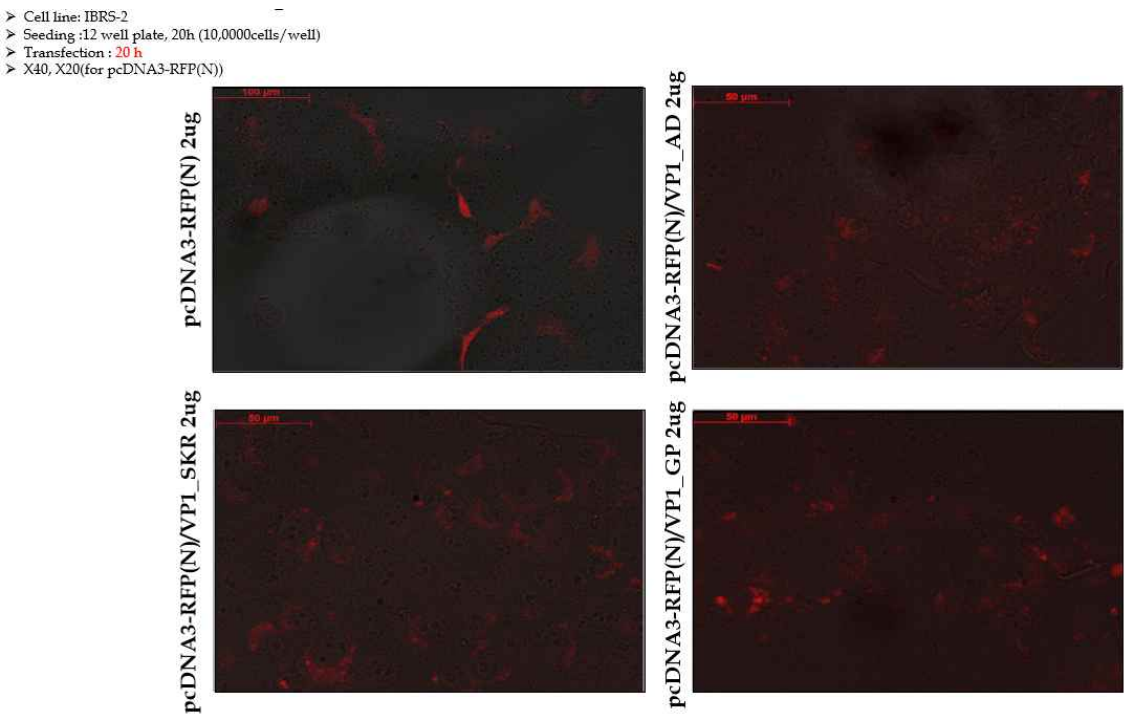
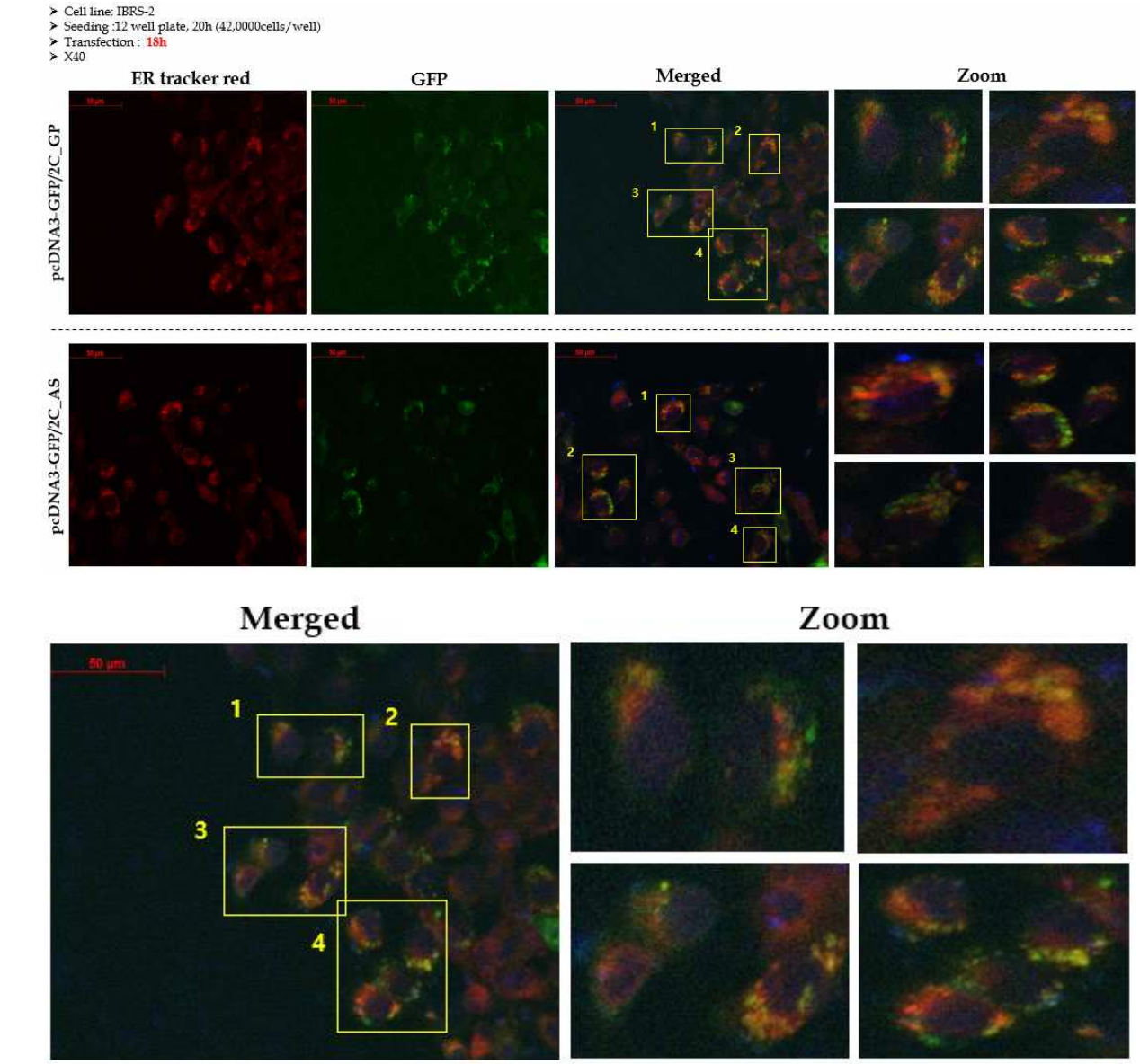


그림 27. FMDV VP1 단백질의 세포내 분포 위치 분석

④ FMDV 2C 변이단백질의 cellular localization

- 2C 단백질은 구제역바이러스의 입자 형성에 필요한 역할을 수행함. 구제역바이러스의 RNA genome과 단백질들은 세포소기관인 소포체내에서 합성되며, 이들 RNA와 단백질들의 assemble에 의한 바이러스 입자 형성도 소포체에서 일어남. 2C 단백질이 구제역바이러스의 세포유입후 세포질에 존재하는 것을 알려져 있지만, 본 연구에서 2C의 보다 정확한 세포내 위치를 분석하고자 하였음

- 2C 변이 유전자들을 녹색 형광을 나타내는 GFP 유전자에 연결하여 숙주세포 내에서 GFP-2C 단백질들이 발현되게 제작하였음. 이 융합 유전자들을 돼지세포인 IBRS-2 세포에 transfection 시킨 다음 형광현미경으로 관찰하였음



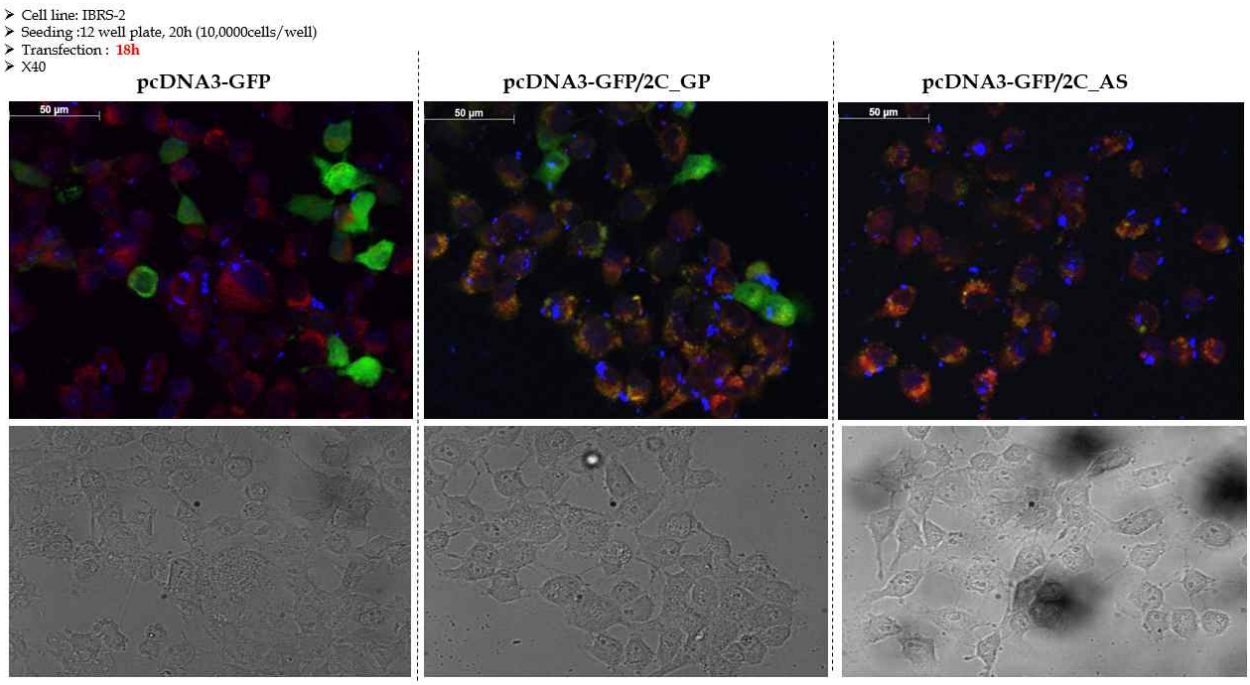


그림 28. IBRS-2 돼지세포에서 FMDV 2C 단백질의 세포내 위치 분석

- 2C 단백질은 GFP로 인하여 녹색 형광을 나타내며, 소포체 위치를 표시하는 ER tracker는 적색으로 표시되었음. 노란색 네모 칸과 숫자로 표시된 지역은 녹색의 2C 단백질과 적색의 ER tracker가 중복되어 노란색 계통의 융합 색으로 나타난 것을 표현한 것임. 이는 2C 단백질이 세포내부의 소포체에 집중하여 분포하는 것을 제시함

- 김포와 안성 지역의 감염 구제역바이러스의 2C 변이 단백질들의 소포체 분포 패턴은 큰 차이가 없어보였음. 2C 단백질들은 핵 주변 소포체에 특히 많이 분포하는 양상을 보였으며, 때로는 소포체내에서 특정 부위에 선별적으로 풍부하게 존재하는 것은 소포체 내에 구제역바이러스 복제 복합체 형성에 관여하는 자리에 위치할 가능성을 제공함

3) FMDV 전파력 인자와 상호작용하는 숙주 단백질 발굴

① FMDV 3D 단백질과 결합하는 숙주세포의 단백질을 발굴

○ 3D protein-conjugated affinity chromatography 와 mass spectrometry 방법을 이용한 3D 결합 숙주 단백질 발굴 : SFPQ(NONO)와 cytoskeleton associated protein 4

- 3D 단백질은 FMDV 전체 RNA genome의 복제를 담당하는 RNA-dependent RNA polymerase로서 기능을 하며 FMDV 바이러스 복제와 전파에 가장 중요한 효소 단백질임. 3D polymerase의 FMDV RNA 복제를 위해서 바이러스 단백질 뿐만이 아니라 숙주세포의 FMDV 복제 관련 단백질들의 상호작용이 필요함

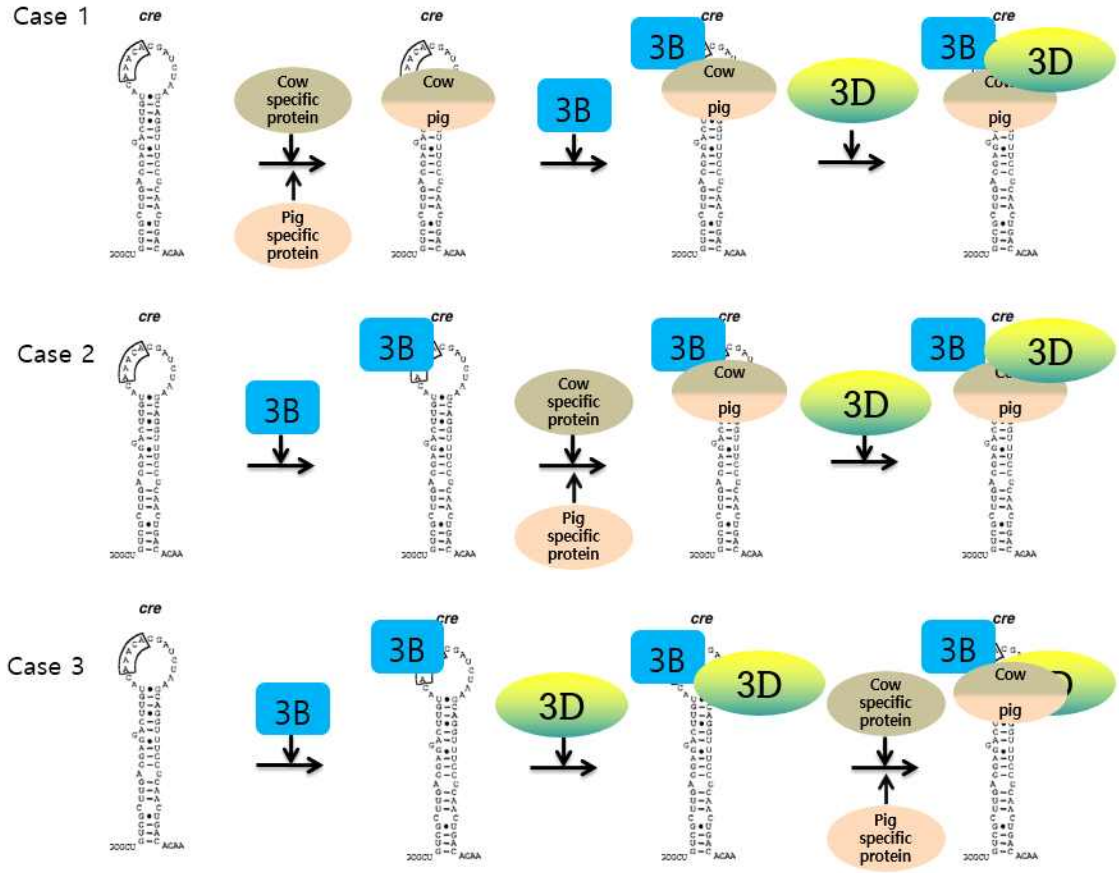


그림 29. FMDV RNA genome 복제에 필요한 FMDV 인자와 숙주세포 단백질의 상호작용 모델

- 숙주세포의 복제 조절 단백질들의 작용 단계는 그림 29와 같이 3단계로 구분할 수 있음. 첫째, FMDV non-coding region의 CRE RNA에 숙주세포 복제 조절 단백질들이 결합하여 FMDV 3B/3D 복제 단백질들이 효율적으로 CRE RNA에 결합할 수 있는 플랫폼 역할을 수행함. 둘째, FMDV CRE RNA에 먼저 FMDV 3B 단백질이 결합하여 RNA 합성을 위한 primer 역할을 하는 과정에서 숙주세포 복제 단백질이 3B 단백질에 결합하여 FMDV 3D polymerase가 보다 강한 복제 복합체를 형성할 수 있도록 scaffolding 역할을 함. 셋째, CRE RNA에 차례로 3B와 3D 단백질이 결합한 상태에서는 FMDV RNA 복제가 느린 속도로 진행되지만 숙주세포 복제 단백질이 CRE/3B/3D 복합체에 결합하여 FMDV RNA 합성을 효율적으로 진행할 수 있도록 유도함

- 3D 단백질과 결합하는 숙주세포 단백질들을 발굴하기 위하여 국내 발생 FMDV들의 3D 변이체 단백질들의 유전자를 His peptide를 tag으로 융합하여 발현하는 E. coli expression plasmiddpi 클로닝하였음 (그림 30). 클로닝된 FMDV 3D 유전자를 His-tag 된 재조합단백질 형태로 제작하여 분리하였음 (그림 31).

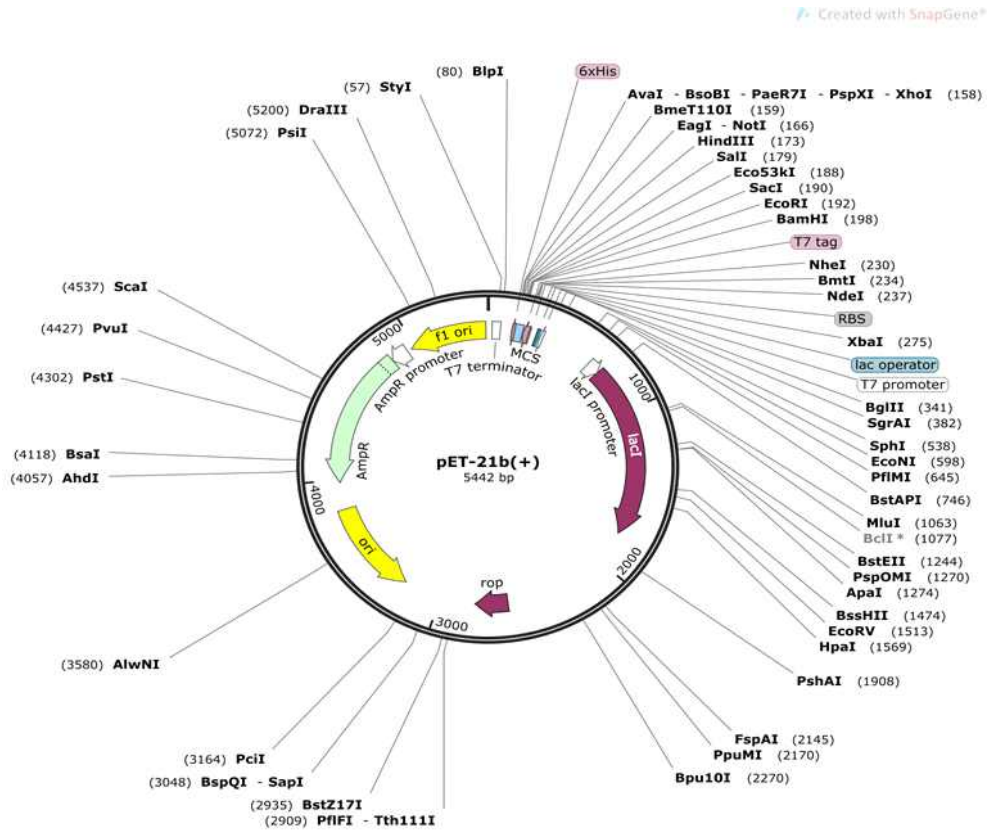


그림 30. His-tag 3D 단백질을 생성하기 위하여 이용한 E.coli expression plasmid

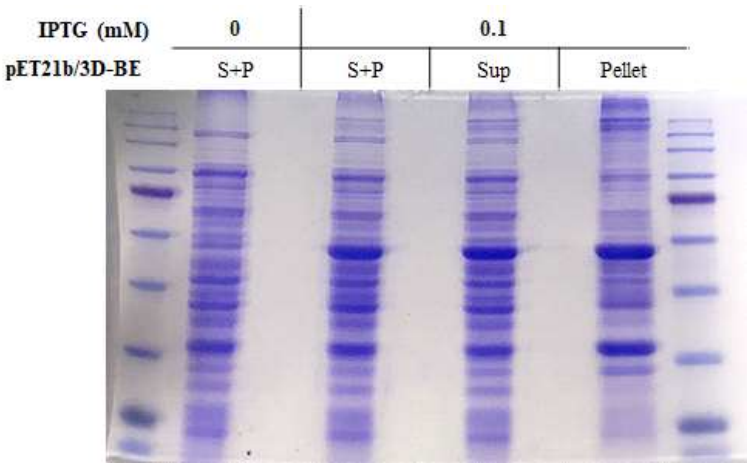


그림 31. His-tag 3D 단백질의 E.coli 세포내 발현

- His-tag 3D expression plasmid를 transformation 시킨 E.coli 박테리아 세포를 초음파로 분쇄시킨 후 세포 추출액을 His-affinity chromatography로 His-tag 3D 단백질이 affinity column에 결합한 상태로 준비하였음 (그림 32).

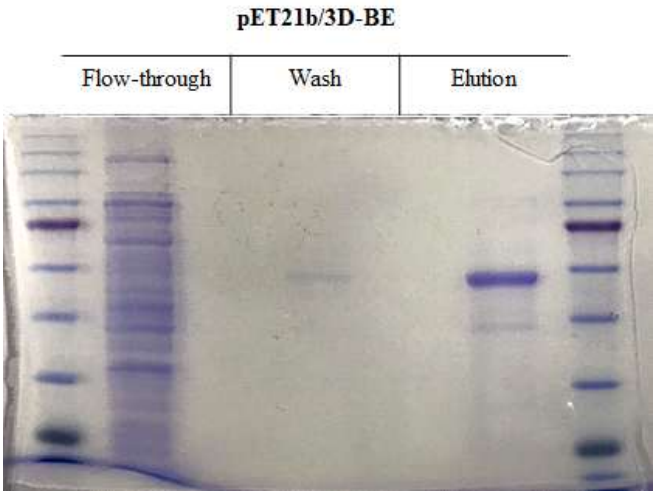


그림 32. His-tag 3D 단백질의 분리 및 affinity chromatography 준비

- MDBK 세포를 대량으로 배양하여 세포추출물을 얻은 다음, His-tag 3D-column에 혼합하여 3D 단백질에 결합한 세포 단백질들을 추출하였음 (그림 33).

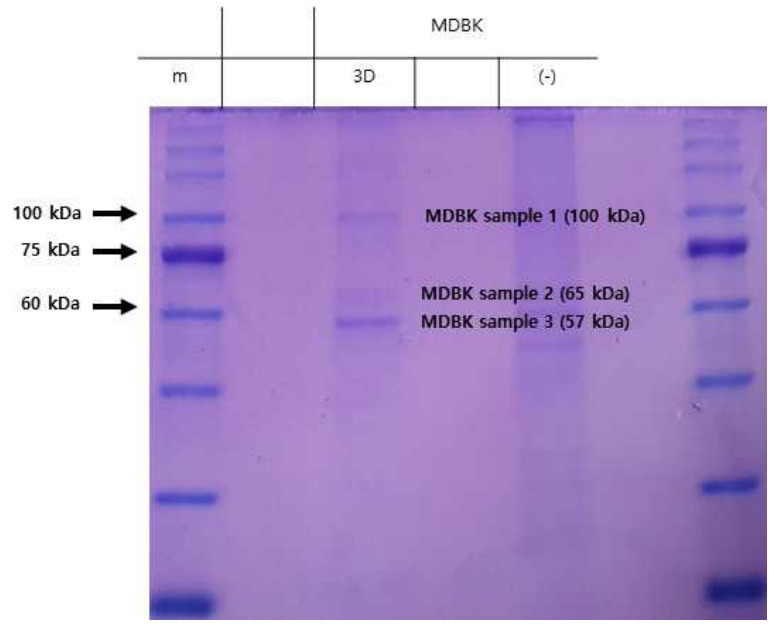


그림 33. FMDV 3D 단백질과 결합하는 숙주세포(MDBK) 단백질들을 SDS-PAGE에서 확인

- SDS-PAGE에는 3개의 단백질 밴드가 관찰되었고, 3개의 단백질들을 SDS-PAGE gel에서 추출하여 mass spectrometry로 단백질 성상을 규명하였음. 그림 33에는 sample 1 (100 kDa)과 sample 3 (65 kDa) 2개 단백질들의 성상이 표시되어있음. sample 3은 FMDV 3D 단백질에 해당함

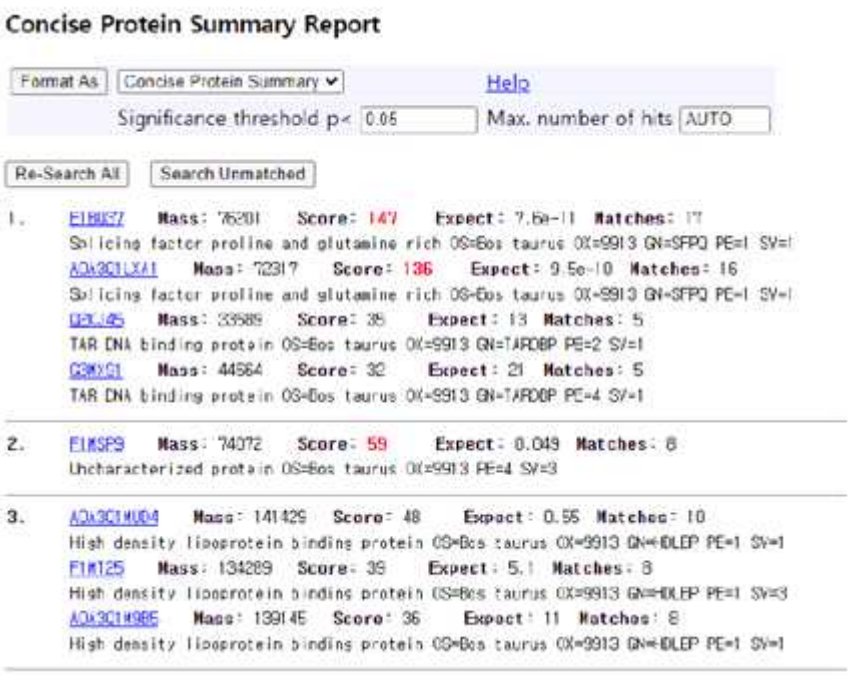


그림 34. FMDV 3D 단백질과 결합하는 MDBK 세포 단백질 sample 1의 성상

- 그림 33의 sample 1에 해당하는 약 100 kDa의 단백질은 mass spectrometry 분석 결과 splicing factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) 단백질로 밝혀졌으면 NONO 라는 이름으로도 알려져있음 (그림 34).polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor (PSF)라고 알려져 있는 단백질로서 2개의 RNA 인식 모티프를 가지고 있음

- SFPQ 단백질은 다양한 바이러스(encephalomyocarditis virus, hepatitis B virus, influenza virus, human T-cell leukemia virus type 1 등)의 복제와 전사 활성을 증가시킴이 보고되어 왔음

- FMDV 3D 단백질과 숙주세포의 SFPQ (NONO) 단백질과의 특이적인 상호결합을 확인하기 위하여 co-immunprecipitation 실험을 수행하였음. 그림 35에서 HA-tag된 3D 유전자를 숙주 돼지세포인 IBRS-2에 transfection 시켜서 HA-3D 단백질 발현을 유도하고, flag-tag된 SFPQ(NONO) 유전자도 transfection한 후 anti-HA 항체로 co-immunoprecipition한 다음 anti-flag 항체로 SFPQ(NONO) 단백질 결합을 확인하였음

✓ Cell: IBRS-2 1.75*10^6 in 100mm culture dish

✓ Gene: pcDNA3-HA/3D_BE 5μg

pcDNA3.1-flag/NONO 5μg

✓ Transfection reagent: jetPEI 2μl / DNA 1μg

✓ 1st Ab: HA (1:1,000), flag (1:1,000)

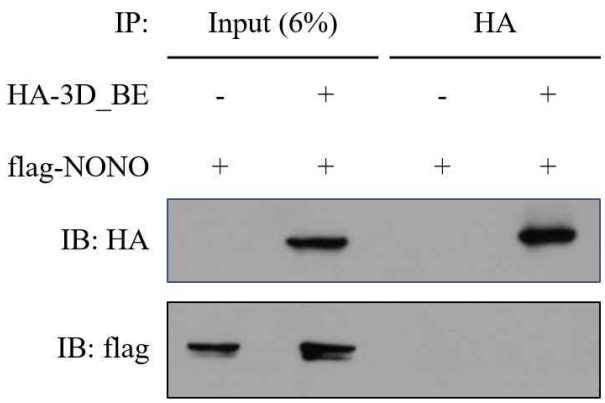


그림 35. FMDV 3D polymerase와 SFPQ (NONO)과의 protein-protein interaction을 확인하기 위한 co-immunoprecipitation 실험

- 그림 34의 3D 단백질과 결합하는 숙주세포 단백질의 sample 2에 해당하는 약 65 kDa의 단백질의 성상은 mass spectrophotometry에서 그림 36의 cytoskeleton associated protein 4로 밝혀졌음

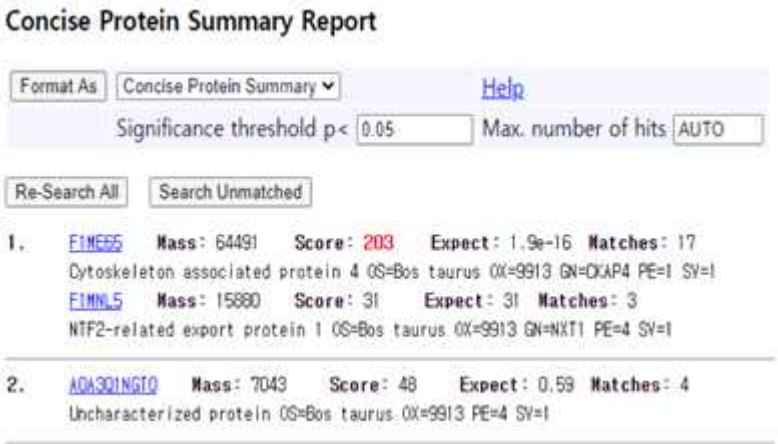


그림 36. FMDV 3D 단백질과 결합하는 MDBK 세포 단백질 sample 2의 성상

- cytoskeleton-associated protein 4 (CKPA4)는 cytoskeleton-linking membrane protein 63 (CLIMP-63)이라고 불리는 단백질로서 세포소기관인 소포체 lumen에 위치하면서 소포체 구조 형성을 촉진하는 역할이 알려져 있음 (그림 37). 3D polymerase가 FMDV 유전자를 복제하는 환경을 조성하는데 CKPA4가 관여하는 가능성을 분석하고자함

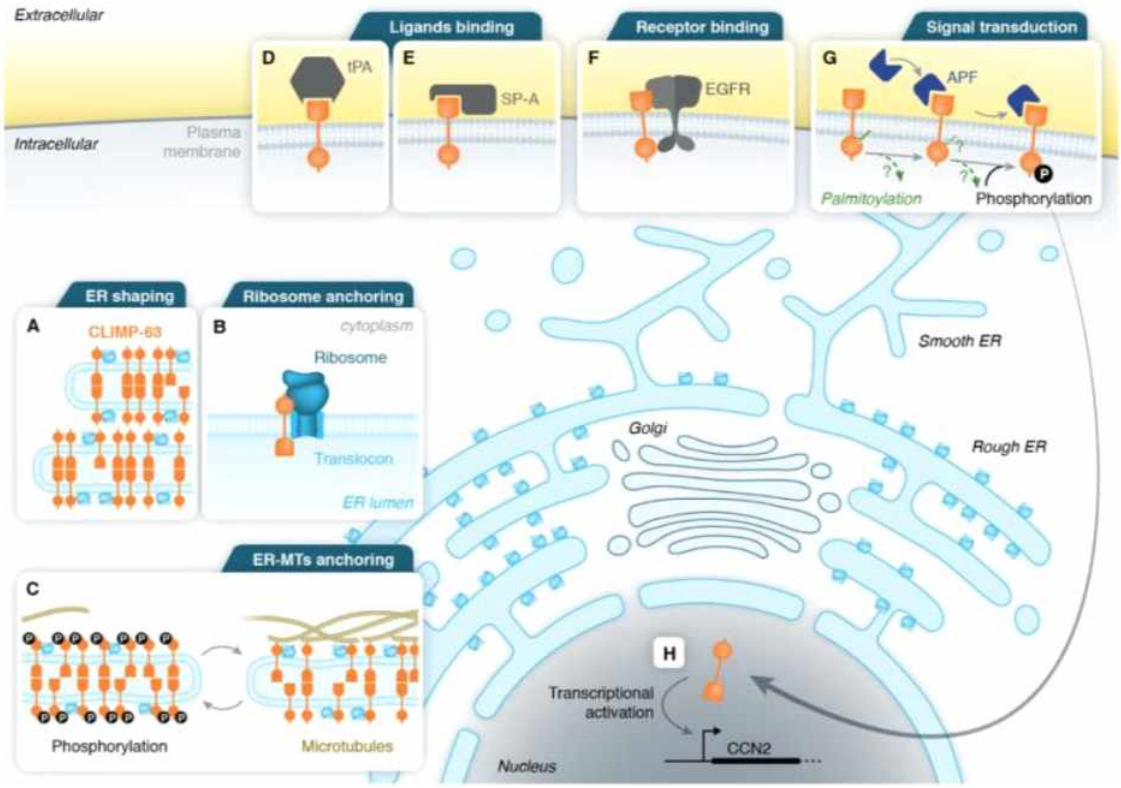


그림 37. FMDV 3D polymerase와 결합하는 돼지세포의 CKPA4 단백질의 기능 모델

○ 3D 단백질과 co-immunoprecipitation 방법으로 획득한 숙주 단백질 분석: PERK

- FMDV RNA 복제는 숙주세포의 세포소기관인 소포체 내에서 지질막으로 구성된 복제 복합체(replication complex)를 형성하고 복제 복합체 내부에서 일어나는 경우가 많음. 효율적인 FMDV RNA 복제를 위해서 3D polymerase가 소포체 내에 위치한 숙주세포 복제 조절 단백질과 상호작용할 가능성이 큼

- FMDV 3D 단백질과 결합하는 세포내 인자를 발굴하기 위하여 3D 코딩 유전자를 HA-tag 단백질 발현 벡터에 클로닝한 recombinant HA-3D construct를 구축함. 이 발현 벡터를 BHK-21 세포내로 형질도입하여 단백질 발현을 확인함. HA-특이 항체를 이용하여 co-immunoprecipitation 방법으로 HA-3D 단백질과 결합하는 세포내 단백질 인자를 획득하여 돼지세포의 후보단백질들에 대한 Western blot assay를 수행하였음

- 그림 38은 왼쪽이 control 항체를 적용하였고, 오른쪽 column이 HA-항체를 이용하여 co-immunoprecipitation 한 결과임. 2개의 column에서 같은 위치의 단백질을 제외하고 특이한 위치의 단백질들을 분석함. 그 결과 세포 소기관인 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스 반응과 연관된 PERK 단백질이 western blot assay에서 동정되었음

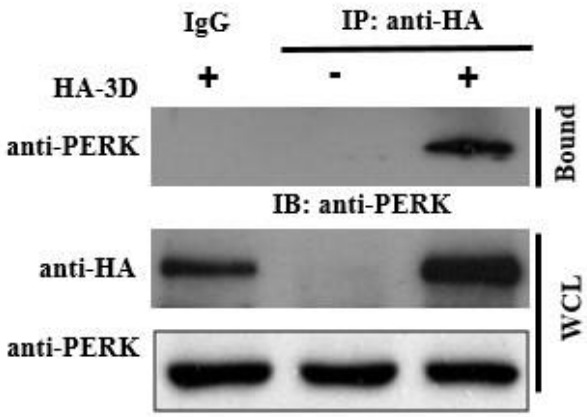


그림 38. 2010년 안동주 FMDV 3D 변이 단백질과 결합하는 숙주세포 PERK 단백질 분석

- 그림 39에서 보듯이, PERK는 ER막을 관통하여 삽입되어있으면서 단백질 합성인자인자인 eIF2alpha의 인산화를 조절하면서 세포의 단백질 합성을 저해하고 ATF4 전사인자의 합성을 촉진함. FMDV 3D 단백질이 ER stress 반응을 제어하는 PERK와 결합하는 것은 바이러스 복제 및 바이러스 입자의 생성을 위한 유리한 세포내 환경을 구축하는 것과 연관됨

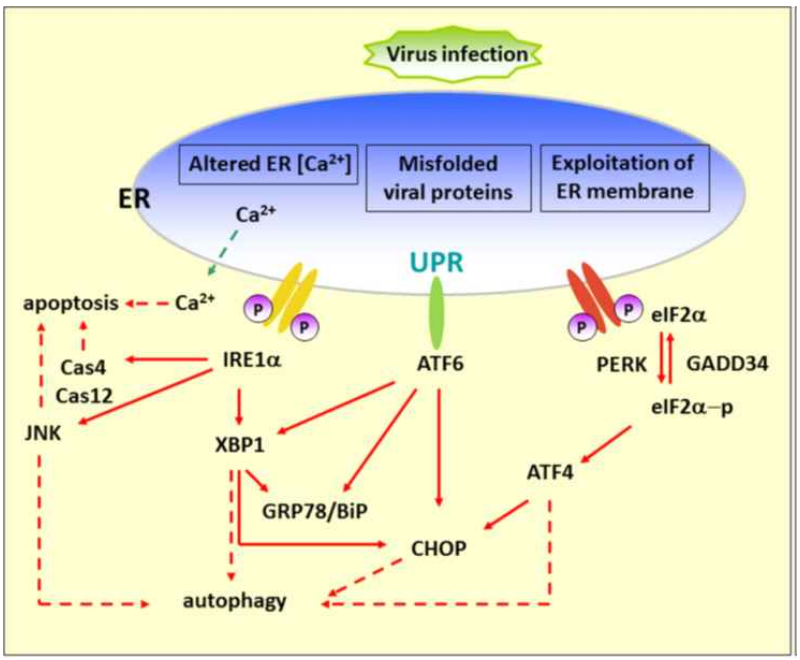


그림 39. 바이러스 감염과 소포체(ER) 스트레스 반응과의 관련 모식도. PERK는 소포체 스트레스를 매개하는 3개의 주요 조절인자들 중 하나임

- 그림 40에서 소와 돼지에서의 PERK 유전자의 서열을 비교 분석하고 차이가 나는 nucleotides을 나타내었으며, 그림 41에서는 PERK 단백질을 구성하는 아미노산의 변이 상황을 비교 분석하였음

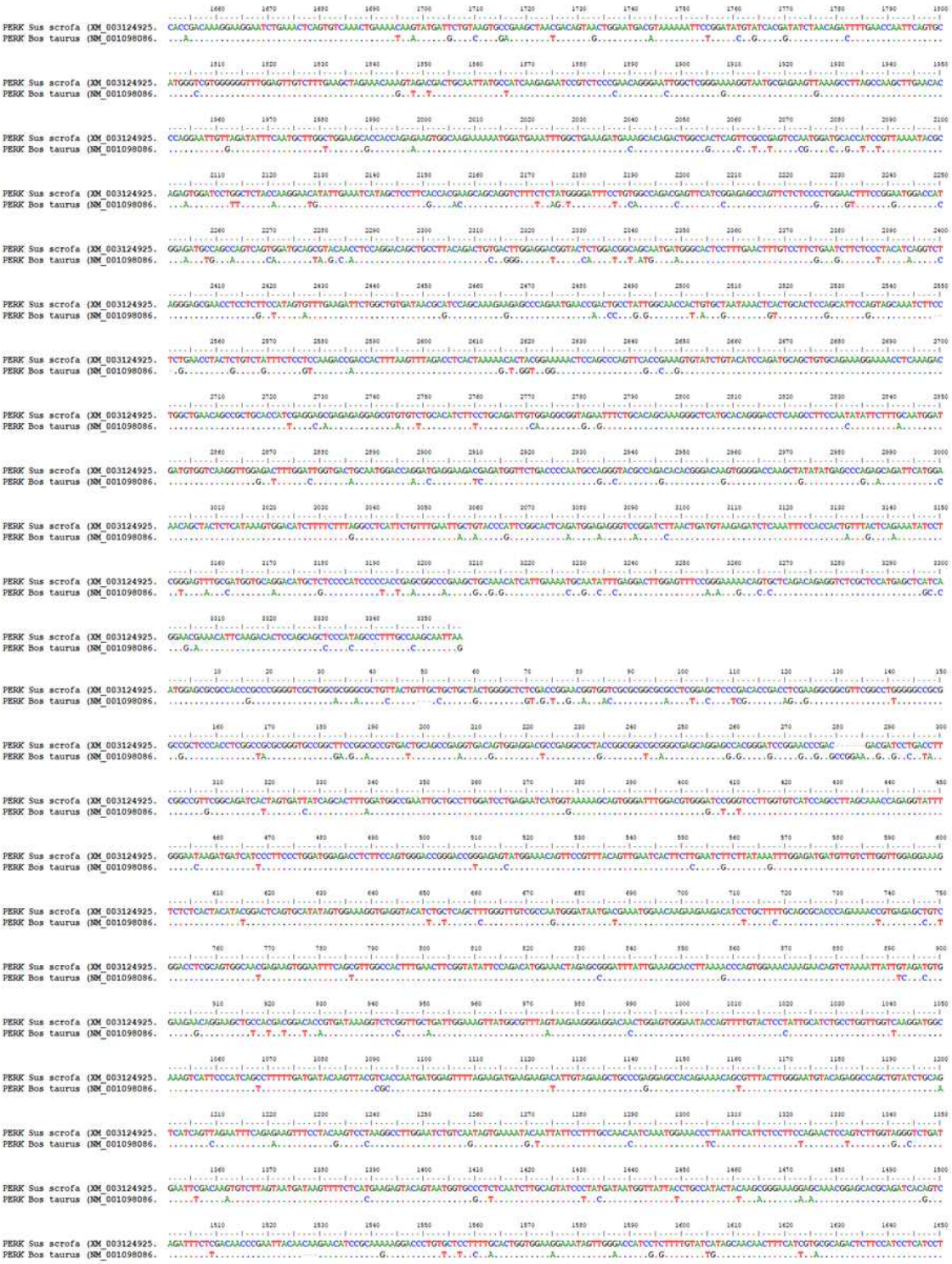


그림 40. 소와 돼지의 PERK DNA 유전자 서열 비교 분석

그림 41. 소와 돼지의 PERK 단백질 아미노산 서열 비교 분석

- PERK 단백질은 ER 막을 관통하여 ER 내부와 세포질에 면한 부분을 함유하고 있고 명칭에서 보듯이 인산화효소 기능도 가짐. 그림 41의 아미노산 구성을 단백질의 기능적 도메일으로 재구성하여 다양한 아미노산의 변이 패턴이 어떤 도메인에 분포하는지를 검토함.

- 그림 42는 3개의 기능 도메인을 보여주고 있음. 첫째, luminal domain은 ER 내부로 향해 있음. ER 내부는 많은 종류의 바이러스들이 존재하는 공간으로서 바이러스 복제도 이곳에서 일어나고 있음. 둘째, Serine/Threonine kinase domain으로서 PERK의 인산화효소 기능을 수행하는 지역임. 셋째, eIF2alpha binding domain은 eIF2alpha 단백질을 인산화 하기 위해서 PERK 단백질이 eIF2alpha 단백질과 결합하는 영역임

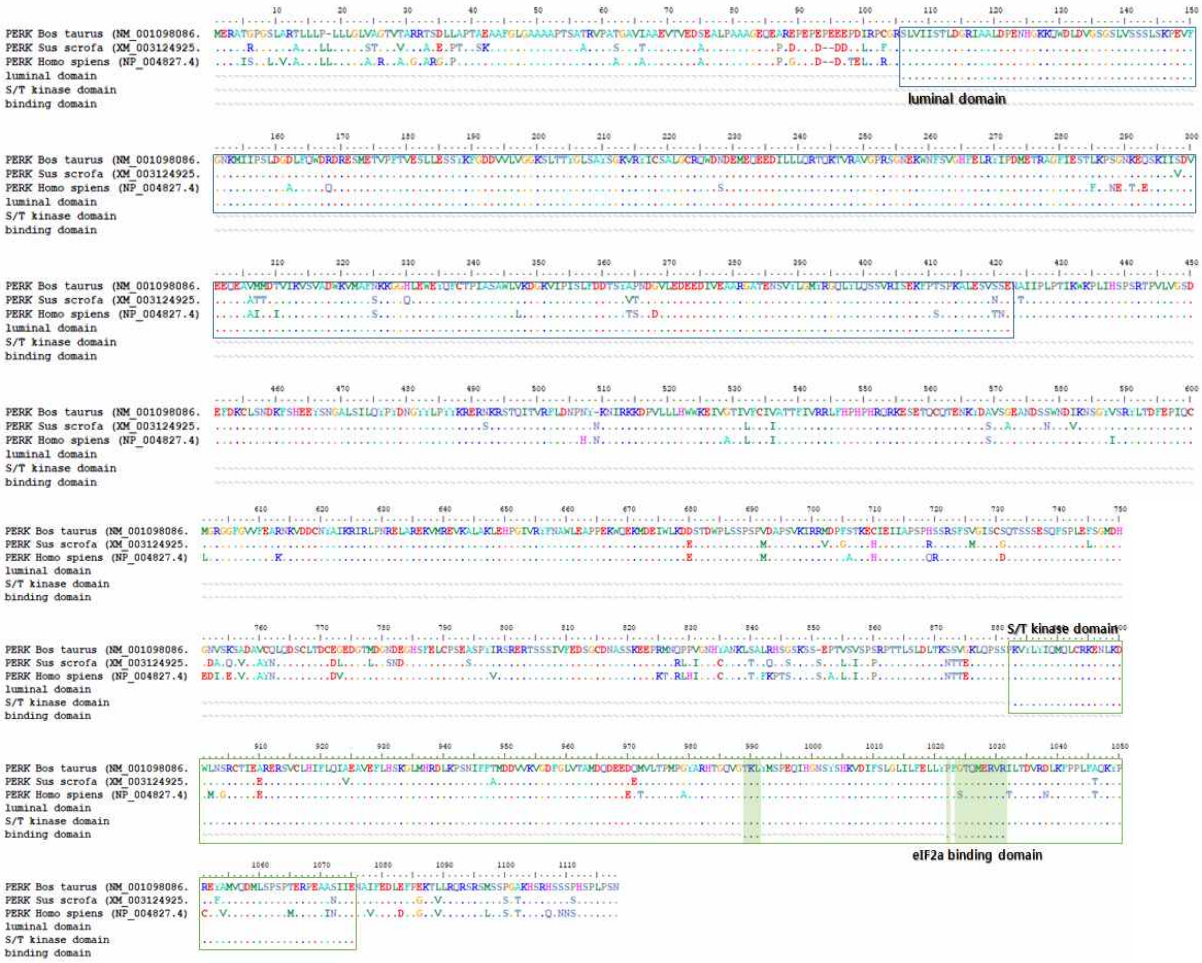


그림 42. PERK 단백질의 기능 도메인 부위 분석

- PERK의 luminal domain이 3D 단백질과 결합할 가능성이 크기 때문에 luminal domain의 아미노산 변이 내용에서 단백질 구조와 연관성이 큰 변이를 검토하기 위하여 변이 아미노산들의 hydropathy index 변화를 분석함. 그림 43에서 보듯이, 298:S(소)/V(돼지), 308:M(소)/T(돼지), 325:N(소)/S(돼지), 그리고 420:S(소)/N(돼지) 에서의 변이가 큰 hydropathy index 변화를 유도함. 이들 아미노산들의 변이와 숙주민감성과의 연관성을 분석할 필요가 있음

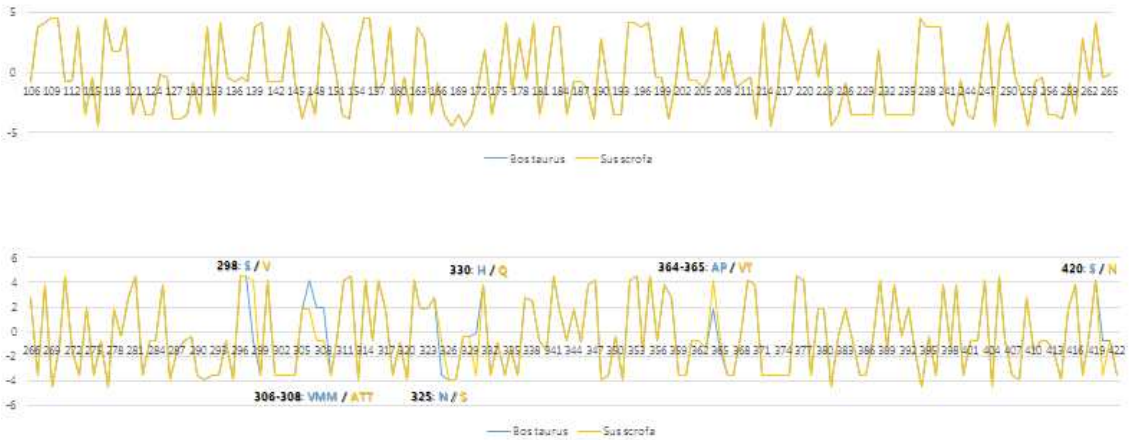


그림 43. PERK luminal domain의 소와 돼지 아미노산 변이의 hydropathy index 변화

- 3D과 ER에 존재하면서 PERK와 상호결합을 하는 사실은 3D와 ER 스트레스 유도와의 상관관련성을 제시함. 3D 단백질을 BHK-21 세포내에서 과량 발현을 유도한 다음 세포 내의 ER 스트레스 매개 인자들의 발현을 조사하였음. PERK 단백질은 ER 스트레스 반응과정에서 ATF4 전사조절인자의 발현을 증가함이 알려져 있음. 그림 44에 보듯이, 3D의 생성은 ATF4의 단백질 수준을 증가시킴을 알 수 있음.

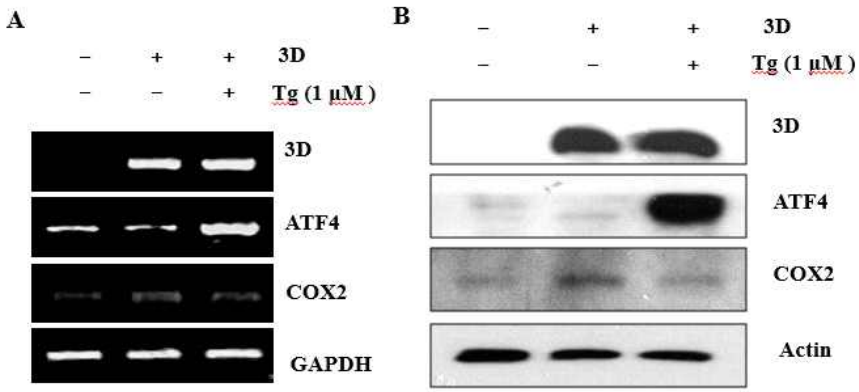


그림 44. 3D 단백질 발현에 의한 소포체 스트레스 관련 유전자 발현 변화 분석

- 이 결과는 3D polymerase의 RNA 합성 기능에 ER 스트레스 반응이 중요하며 이때 작용하는 숙주세포의 종특이 ER 스트레스 매개인자들의 상호작용이 3D polymerase의 FMDV 복제를 조절함을 제시함

② FMDV CRE RNA와 결합하는 숙주세포 단백질 발굴

○ PCBP2 숙주세포 단백질 결합

- FMDV CRE RNA는 FMDV 게놈 복제 과정의 첫 단계에서 FMDV 3B 단백질이 결합하여 RNA 복제를 위한 프라이머 역할에 필수적인 RNA임. 그림 45에서 보듯이, 숙주세포 특이적인 세포 단백질이 CRE RNA에 결합하여 FMDV 3B 단백질이 FMDV RNA 복제복합체 형성을 용이하게 할 수 있도록 도와주는 역할을 할 수 있으리라 추측됨.

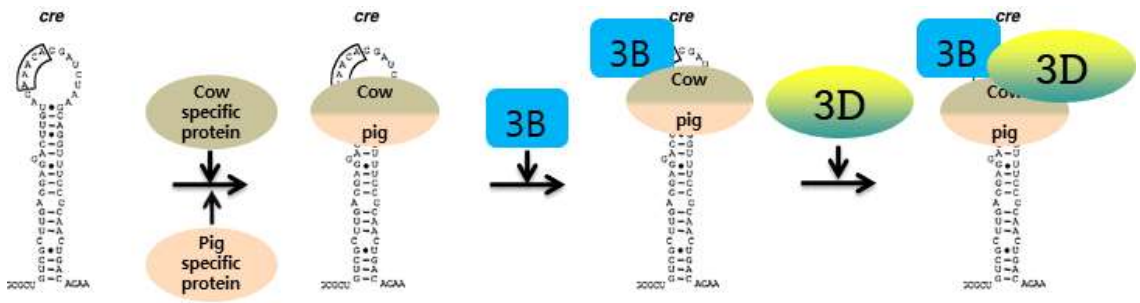


그림 45. FMDV CRE RNA에 결합하는 바이러스 단백질 3B와 숙주세포 단백질의 상호연관성 모델

- CRE RNA에 결합하는 숙주세포 단백질을 발굴하기 위하여 CRE RNA-affinity chromatography 방법을 이용하여 세포 단백질을 분리하였음. 그림 46A에는 국내 발생 FMDV (O/JC/SKR/2014/P와 O/US/SKR/2014/P)을 template RNA로 사용하였음. 그림 46B는 template RNA의 2차구조를 표시한 것임. 그림의 2차구조의 loop과 stem과 6각형/7각형들의 특징적인 부위에 단백질들이 결합할 수 있음. 그림 46C는 CRE RNA에 결합하는 숙주세포의 단백질들의 SDF-PAGE로 분리하고 PCBP2 항체로 확인하였음. PCBP2는 hepatitis C virus와 norovirus 등 몇 RNA 바이러스 복제 조절 부위 RNA에 결합하여 바이러스 복제를 조절하는 것일 알려져 있음

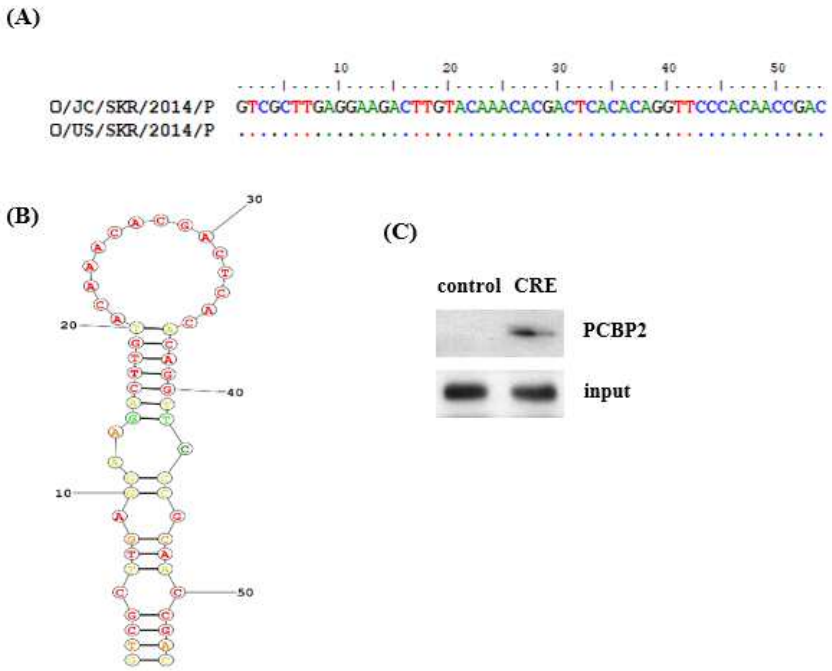


그림 46. FMDV CRE RNA에 결합하는 숙주세포 단백질 발굴

- CRE RNA에 결합하는 숙주세포 단백질로 동정된 PCBP2는 소와 돼지에서 한 부위에서 4개의 아미노산 차이를 보이고 있음 (그림 47A). CRE RNA와 PCBP2 단백질간의 RNA-protein interaction은 RNA-affinity chromatography에 의해서 in vitro 에서 검증되었음 (그림 47B). 돼지에 감염된 FMDV에서 획득한 CRE RNA는 소 PCBP2 보다 돼지의 PCBP2와 더 강하게 결합하는 것을 알 수 있음 (그림 47C).

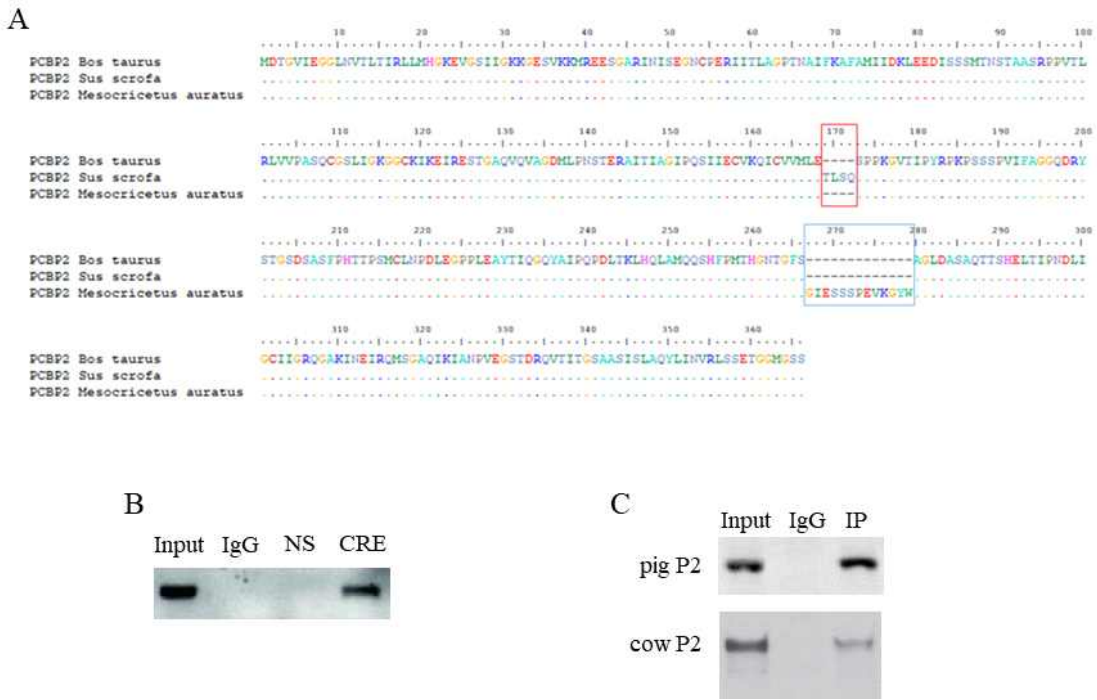


그림 47. FMDV CRE RNA와 결합하는 숙주세포 단백질 PCBP2의 유전자 서열 비교 분석과 in vitro RNA-protein interaction

- 반대로 소에 감염된 FMDV (A/PC/SKR/2010/C)에서 유래한 CRE RNA는 전체 54개의 nucleotides 중에서 8개 nucleotides가 다르며 RNA 2차구조도 다름 (그림 48A). 그림 48B에서 돼지 PCBP2는 소 감염 유래 FMDV (A/PC/SKR/2010/C) 보다 돼지 감염 유래 FMDV (O/JC/SKR/2014/P) CRE RNA에 결합을 더 강하게 하며, 그림 48C는 반대로 소의 PCBP2는 돼지 감염 유래 CRE RNA 보다 소 감염 FMDV CRE RNA와 잘 결합함을 알 수 있음.

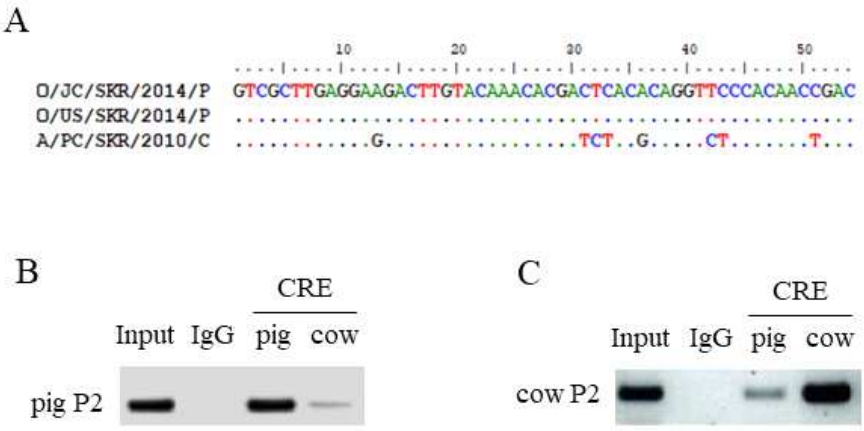


그림 48. 종특이성을 보이는 FMDV CRE RNA와 PCBP2 상호결합

- FMDV CRE RNA와 PCBP2의 복제복합체 형성에 FMDV 3B 단백질도 함께 결합에 관여하는지를 조사하였음. 그림 49A에서 co-immunoprecipitation 방법에 의해 PCBP2와 3B 단백질이 특이적으로 상호결합함을 규명하였음. 그림 49B는 CRE-3B-PCBP2 3개 분자의 복합체 형성 역시 소와 돼지 종특이성을 나타냄을 보여줌

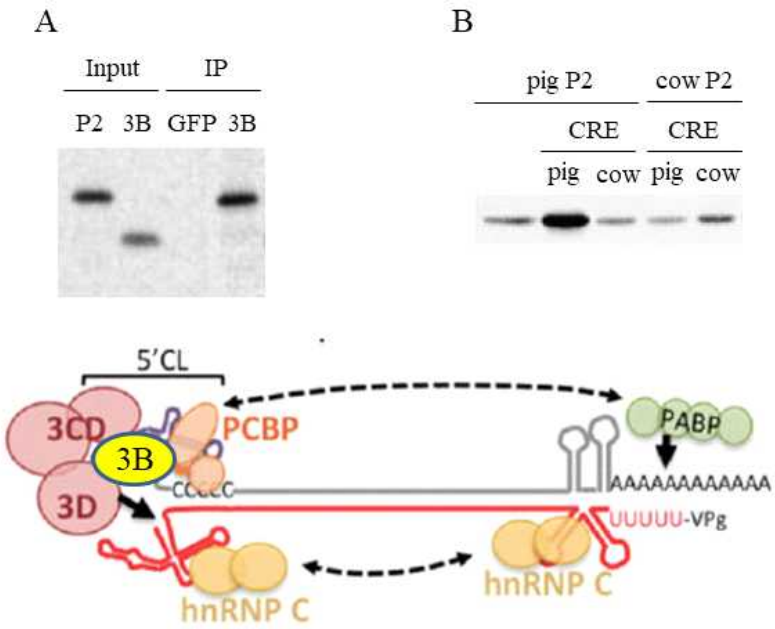


그림 49. PCBP2는 CRE와 함께 FMDV 3B 단백질과 상호결합함

4) FMDV 전파력 인자와 숙주 단백질 간의 상호작용과 세포 영향 분석

① FMDV 2C 단백질의 소포체 스트레스와 세포 염증반응 발생

- FMDV 2C 단백질은 다음과 같은 특징과 기능을 가지고 있음
  - ♦ 동·식물 상관없이 많은 RNA virus에 2C-like protein 존재하며 유전자 서열도 잘 보존되어있음
  - ♦ 318 아미노산으로 구성되며 N-말단(17-34aa)에 amphipathic helix가 존재하여 membrane targeting 역할을 하는 것으로 추측
  - ♦ 구제역바이러스 RNA 복제 복합체 형성에서 요구되는 소포체 막에 결합하는 주요 요소 작용
  - ♦ 소포체 막의 견고성과 배열에 관여하여 바이러스 복제 복합체 형성에 기능을 하며 바이러스 감염에 의한 세포손상을 유도
  - ♦ 구제역바이러스 복제에 중요한 인자로서 guanidin hydrochloride (2C의 길항제) 처리 시 바이러스 RNA 합성을 억제하며 guanidin-저항성 2C 변이체의 경우 저해 효과가 없음
  - ♦ 바이러스 증식 동안 복제 복합체에 관여하기 때문에 백신 접종 가축과 구제역 발병 가축과 구분할 때 사용
  - ♦ N-myc and STAT interacting (Nmi) 단백질과 결합하여 apoptosis를 유도하며 IFN에 의해 유도되는 35-kDa protein (IFP35)와의 결합을 통해 type I IFN 반응에 관여함이 보고됨
  - ♦ Beclin1(autophagosome 형성 개시, autophasome의 리소좀 융합 기능)와의 결합을 통해 구제역바이러스에 의해 유도되는 autophagy에 관여함. 2C-induced Beclin1 불활성화를 통하여, 구제역바이러스의 autophagosome의 융합과정을 억제하여 바이러스의 분해를 막을 수 있음

- 2C 단백질은 소포체에 존재하면서 바이러스 RNA 복제 복합체 형성에 중요한 역할을 하기 때문에 2C 단백질과 소포체 스트레스 (ER stress)와의 관련성은 FMDV RNA 복제 조절에 큰 영향을 미칠 수 있음. 이에 2C 단백질 발현에 의한 숙주세포의 ER stress 유도 여부에 대한 분석을 수행하였음. 그리고 ER stress는 pro-inflammatory cytokine 생성을 증가시킴이 알려져 있음. FMDV 2C 단백질의 세포 발현이 pro-inflammatory cytokine인 TNFalpha의 생성을 증가시키는지 조사하였음

- 서로 다른 아미노산 변이체를 가진 2C 단백질의 숙주세포 내에서 발현할 수 있는 plasmid를 제작하여 transfection 방법으로 돼지세포인 IBRS-2 세포내에서 2C 단백질을 발현시켰음. 그림 50A에서 2C 단백질 발현은 세포 내에서 TNFalpha 유전자 발현을 조절하는 promoter에 반응하여 유전자 발현을 증가시킴을 알 수 있었음. TNFalpha 유전자 발현에 ER stress 반응을 매개하는 전사조절인자들 중에서 어떤 전사인자가 전사 활성화를 유도하는지를 규명하기 위해 XBP1, ATF4, ATF6, CHOP 전사인자들을 IBRS-2 세포내에 transfection 시켜 TNFalpha promoter의 활성화 정도를 비교하였음. 그림 50B에서 ATF4 전사인자가 가장 강하게 TNFalpha promoter 활성을 증가시킴을 알 수 있었음

- FMDV 2C 단백질의 세포내 발현은 ER stress 반응을 매개하는 ATF4 전사인자와 pro-inflammatory cyokine TNFalpha의 mRNA 생성을 증가시켰음 (그림 50C). 그림 50D에서는 ATF4와 TNFalpha 단백질 생성의 증가가 FMDV 2C 단백질에 의해서 유도됨을 확인하였음

-

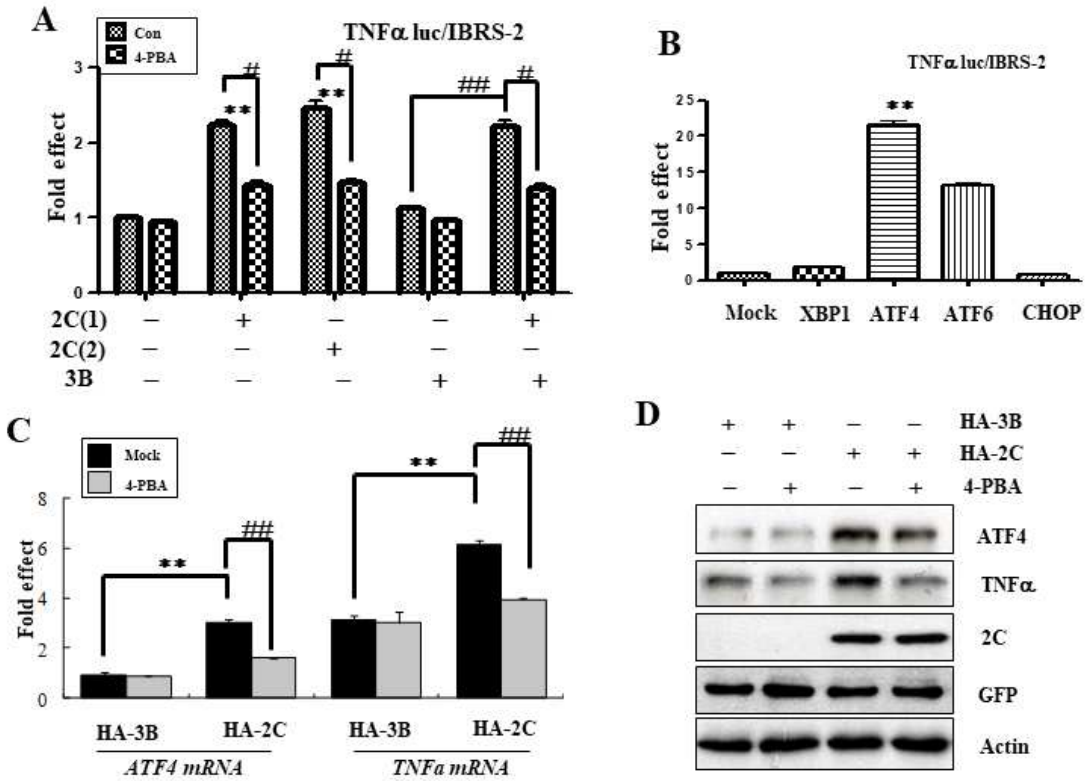


그림 50. FMDV 2C는 염증성 cytokine TNFalpha 발현을 증가시킴

- 그림 51A에서 ATF4 전사인자가 돼지세포 내에서 TNFalpha의 전사활성 결과물인 mRNA의 생성을 증가시킴을 확인하였고, 그림 51B에서는 단백질 발현이 mRNA 생성과 promoter 활성화 결과와 일치하게 증가함을 알 수 있었음. ATF4는 전사조인자인 CBP와 SRC1과 협조적으로 TNFalpha의 promoter 활성을 증가시킴을 새롭게 규명하였음 (그림 51C).

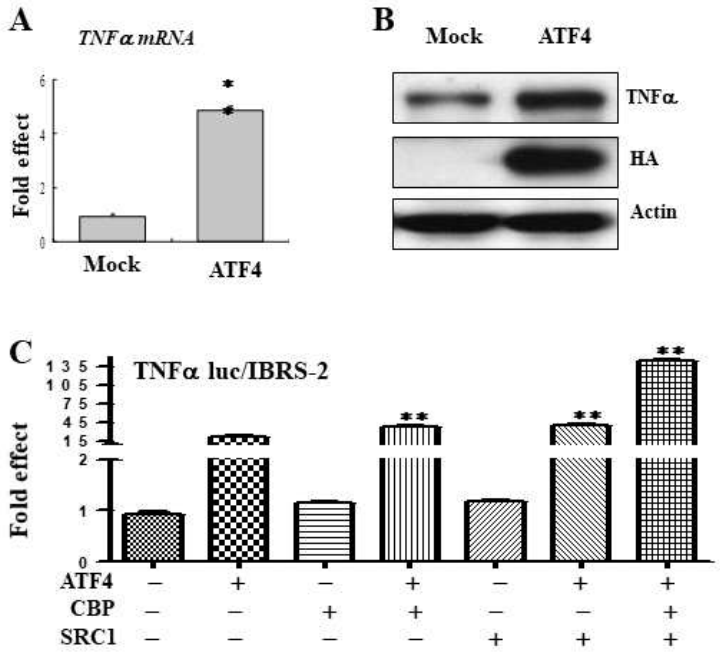


그림 51. ATF4가 돼지세포에서 TNFalpha의 발현을 증가시킴

- 앞선 실험에서 FMDV 2C 단백질이 ATF4 전사인자의 생성을 증가시키고, ATF4는 TNFalpha의 promoter 활성을 증가시키며 TNFalpha의 mRNA와 단백질의 발현을 증가시킴을 밝혔음. 이에 근거해서, FMDV 2C 단백질이 ATF4 전사인자를 매개로해서 TNFalpha 유전자 발현을 증가시키는 가능성을 조사하였음. 2C 단백질 발현은 ATF4 발현이 함께 이루어졌을 때 TNFalpha mRNA 합성을 많이 증가시켰음 (그림 52A). 하지만, ATF4 전사인자의 dominant negative mutant 기능을 하는 ATF4DN을 과다발현시키면, TNFalpha mRNA 발현이 현저히 감소함을 알 수 있었음. 이 실험결과들은 2C 단백질에 의한 TNFalpha 유전자 발현 증가는 ATF4 전사인자 의존적임을 제시함

- 바이러스 감염에 의한 조직의 손상은 많은 경우 비정상적으로 활성이 강한 면역세포들에 의하 과도한 세포손상이 원인일 경우가 많음. 바이러스 감염에 의한 면역세포의 recruitment를 증가시키는 chemokine인 SDF-1alpha의 발현이 FMDV 2C 단백질에 의해 조절되는지를 조사하였음. 그림 52A에서 2C 단백질은 SDF-1alpha의 mRNA 발현을 증가시켰으면, TNFalpha와 마찬가지로 ATF4DN 단백질의 발현에 의해서 SDF-1alpha의 mRNA 생성 정도가 감소하였음. 이들 실험 결과들은 FMDV 2C 단백질에 의한 TNFalpha와 SDF-1alpha의 mRNA 유전자 전사 발현이 ER stress 반응을 매개하는 ATF4 전사인자 의존적임을 제시하였음

- 그림 52A에서 나타낸 2C 단백질에 의해 활성화된 ATF4 전사인자가 SDF-1alpha와 TNFalpha의 mRNA 발현을 증가시킨 결과를 더 검증하기 위하여 Western blot assay을 이용하여 단백질 발현 정도를 분석하였음. 그림 52B를 통하여 mRNA 발현 분석 결과와 일치하게 2C 단백질에 의해서 TNFalpha와 SDF-1alpha의 단백질 생성이 증가함을 알 수 있었음

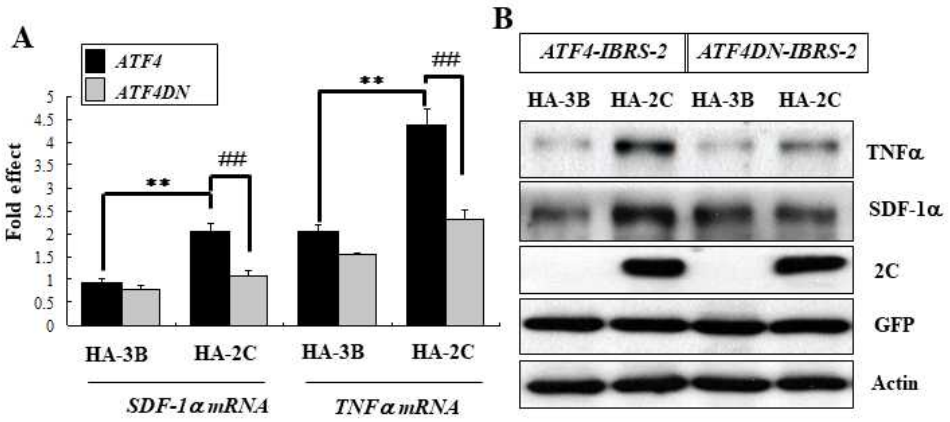


그림 52. FMDV 2C는 ATF4 활성화를 통하여 TNFalpha와 SDF-1alpha의 발현을 증가시킴

5) FMDV 전파력 결정인자들의 유전적 변이 분석

- 2002년부터 2019년 까지 국내에서 발생하였던 구제역에서 획득한 FMDV의 전장 유전자 서열을 농림축산검역본부 구제역진단과에서 분석하였음. 그리고 PubMed와 국제공동협력을 통해서 얻은 국외 발생 FMDV 서열을 함께 이용하여 FMDV 전파력 결정인자 각각의 유전자 변이를 비교 분석하였음. 아래에는 가장 최근에 국내에서 발생한 2019년 구제역을 중심으로 획득한 FMDV 유전자 서열을 검토하였음

① CRE RNA nucleotides의 유전자 변이 분석

- 전체 54개의 RNA nucleotides로 구성되어있으며 nt 625에서 시작되는 AAACA는 필수적으로 잘 보존된 서열을 관찰할 수 있음. AAACA를 중심으로 CRE 부위는 loopling 2차구조를 가지게 됨. 그림 14에서 2019년 발생 FMDV CRE RNA 서열과 2017년 발생 FMDV CRE RNA 서열을 비교하면 바이러스의 유래가 다름을 알 수 있음

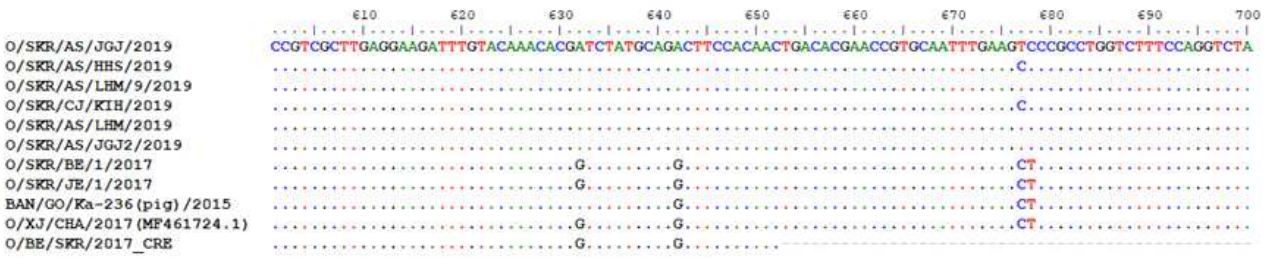


그림 53. FMDV CRE 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- IRES는 FMDV-encoding protein을 생성에 있어서 필수적인 조절 인자임. 다양한 IRES 변이 서열을 FMDV replicon에 클로닝하여 IRES 반응의 기능 변화를 분석할 것임

-

그림 54. FMDV IRES 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV L 단백질은 protease 기능을 가지면 mature protein을 만드는데 중요한 기능을 함. 2017년에는 없는 변이 내용을 포함한 FMDV 변이주 제작에 활용할 수 있음

그림 55. FMDV L protein 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV VP1 유전자 서열의 변이 중에서 integrin alpha5와 결합하는 부위의 변이를 포함한 재조합 단백질 발현으로 소와 돼지 유래의 다른 integrin alpha5와의 결합 기능 변화를 분석하는데 활용함

그림 56. FMDV VP1 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV VP3의 유전자 변이 내용이 VP1과 integrin alpha5의 상호결합의 기능 변화에 영향을 주는지를 분석하는데 활용

그림 57. 국내발생 FMDV VP3 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 2A 단백질은 18 아미노산 크기를 가지고 있으며 다른 picornavirus에 비해 매우 짧지만, 2A/2B 연결 영역은 잘 보존되어있음. (2A)NPG↓P(2B)의 G가 절단 활성에 매우 중요

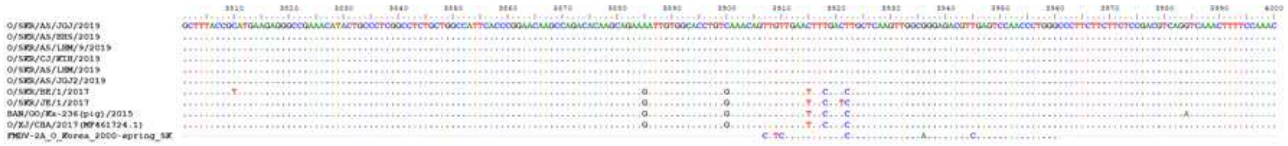


그림 58. 국내발생 FMDV 2A 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 2B 단백질은 viroporin의 기능을 가지며 저분자의 소수성 transmembrane 단백질 구조를 가짐. transmembrane 소수성 도메인은 세포막의 인지질과 결합하여 투과성을 증가시켜 바이러스 입자의 방출을 촉진함. viroporin 기능이 제거되면 적절한 바이러스의 입자의 조립과 방출이 억제됨. 이 사실은 항바이러스제 개발의 표적이 될 수 있음

그림 59. 국내발생 FMDV 2B 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 2C 단백질은 동·식물 상관없이 많은 RNA virus에 2C-like protein 존재하며 유전자 서열도 잘 보존되어있음. 318 아미노산으로 구성되며 N-말단(17-34aa)에 amphipathic helix가 존재하여 membrane targeting 역할을 하는 것으로 추측. 구제역바이러스 RNA 복제 복합체 형성에서 요구되는 소포체 막에 결합하는 주요 요소로 작용. 소포체 막의 견고성과 배열에 관여하여 바이러스 복제 복합체 형성에 기능을 하며 바이러스 감염에 의한 세포손상을 유도. 다양한 2C 변이체 단백질 발현시스템을 제작하여 기능 변화 효과를 분석하고 있음

그림 60. 국내발생 FMDV 2C 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 3A 단백질은 153 아미노산으로 구성되며 다른 picornavirus들의 3A보다 큼 (poliovirus의 3A는 87aa). 구제역바이러스의 거의 모든 strain에서 유전자 변이가 적고 잘 보존되어있음. N-말단(1-75aa) 영역은 매우 잘 보존되어있는 반면, C-말단에는 많은 염기 돌연변이와 유전자 일부 영역의 결실이 존재

-

그림 61. 국내발생 FMDV 3A 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 3B 단백질은 FMDV 게놈의 5'-말단에 공유결합으로 결합함. 구제역바이러스를 포함한 picornavirus RNA 합성의 primer 기능을 수행. FMDV 만의 특징으로서 비슷하지만 동일하지는 않은 3 copy (3B1, 3B2, 3B3)가 존재 (다른 picornavirus의 경우 단일 copy). 3B의 uridylylation은 picornavirus RNA 게놈 복제의 첫 단계이며, VPgU(pU) 형성은 peptide primer로 기능함. 잘 보존된 Tyr3 자리에 3Dpol에 의한 2개의 UMP 결합은 cre를 주형으로 사용. 3 copy 모두 in vitro에서는 uridylylation이 가능 하지만, 3Dpol에 대해 3B3가 가장 효율적인 주형으로 작동되며 3B3 유전자의 결실 시, RNA 복제가 되지 않음 (3B1, 3B2도 감소하기는 하지만, 3B3에 비해 극적이지 않음)

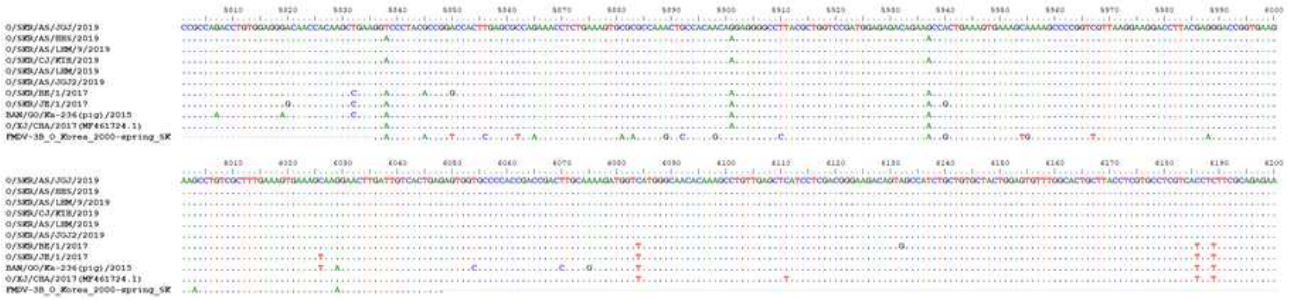


그림 62. 국내발생 FMDV 3B 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 3C 단백질은 chymotrypsin-like cysteine protease의 기능을 가지며 대부분의 FMDV 단백질들의 절단에 의한 활성 단백질들의 생성을 담당. Q-G, E-G, Q-L, E-S 등을 절단 (poliovirus와 같은 다른 picornavirus의 3Cpro는 Q-G만 cleavage). eIF4A(cap-binding complex의 RNA helicase)와 eIF4G(Lpro보다 뒤쪽 자리를 절단) 숙주세포의 단백질 합성인자들을 절단하여 숙주세포의 정상적인 기능을 저해. 3CD 형태로 핵 내로 이동(3Dpol의 N-말단에 핵내 이동 아미노산 서열이 존재)하며 Sam68 (68 kDa Src-associated substrate during mitosis)의 C-말단의 핵내 이동 아미노산 서열을 포함하는 18kDa 부분을 잘라냄. 남은 Sam68(~50kDa)은 세포질에 위치하여 단백질 합성 조절 영역인 IRES와 결합하여 바이러스 RNA의 단백질 합성을 촉진

그림 63. 국내발생 FMDV 3C 2017년과 2019년 유전자 변이 분석

- FMDV 3D 단백질은 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)로서 바이러스 전체 게놈 유전자의 복제를 위한 positive/negative-sense RNA를 합성. 서로 다른 serotype과 subtype에도 유전자 변이는 다른 지역 보다 적으며 잘 보존되어있음. 자연 상태에서 발견되는 3CD 단백질은 바이러스 복제 시 중간 기능을 수행. 'palm', 'fingers', 'thumb'로 이루어진 'right-hand' 단백질 구조를 가짐. plam 영역에는 복제효소 활성 부위가 존재하며 모든 RNA 중합효소들에 잘 보존되어 있고, 5개의 motif로 구성(3-stranded antiparallel core β sheet 세 개, 사이에 2-α helix)되며 전체 3D 중합효소의 구조적 견고성과 뉴클레오티드 인식 결합 그리고 RNA 복제를 위한 개시 뉴클레오티드 결합의 기능을 수행함. thumb 도메인은 C-말단에 위치하며 가장 다양한 특징들을 보임. 구제역바이러스의 경우 효소 활성 부위 공간에 VPg가 결합함 (uridylyation 반응). CVB3의 경우 thumb sub-도메인, EV71의 경우 palm 도메인의 바닥 부분에 결합

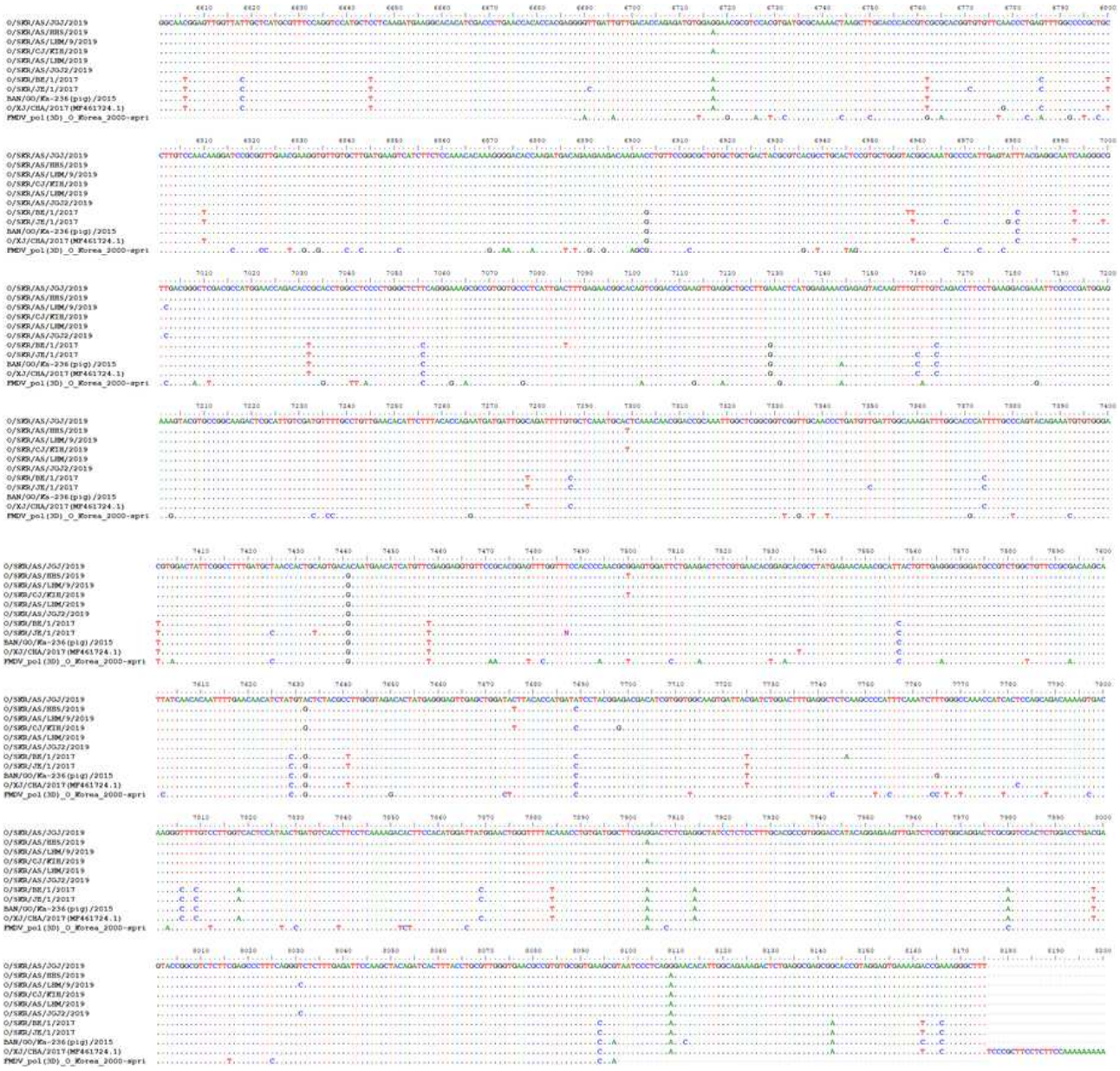


그림 64. 국내발생 FMDV 3D 2019년 유전자 변이 분석

6) 숙주 단백질의 소와 돼지에서 유전자 변이 분석

① FMDV VP1 단백질의 세포 수용체로 작용하는 integrin alpha5와 beta6의 소와 돼지의 아미노산 차이 분석

- 소와 돼지에서 같은 기능을 하는 동일 단백질의 nucleotide와 아미노산 변이 상황을 비교하였음. 숙주세포의 전파력 관련인자 단백질에서 기능적으로 구분되는 도메인 별로 변이 상황을 정리하여 특정 유전자 변이가 숙주단백질의 어떤 기능의 변화를 유도하는 지를 분석하였음. 이의 결과들은 추후 숙주세포 인자들의 변이체 제작을 위한 변이 아미노산을 선택하여 FMDV VP1 단백질 변이체들과의 상호결합 기능 변화 분석에 이용하고 있으며, 향후 FMDV 변이주 제작에도 활용하고자 함

- 숙주세포의 integrin[alpha V/ beta 6]의 소와 돼지에서의 유전자 변이 내용을 그림 65에 나타내었음. 그림에 보듯이, 적색 네모로 둘러싼 아미노산이 소와 돼지에서 차이가 나는 아미노산임. 이 아미노산 차이가 구제역바이러스의 종류에 따라서 숙주별 전파력의 차이를 유도할 수 있음. 본 과제에서 이와 같은 숙주세포 단백질의 차이의 기능을 FMDV VP1의 세포내 단백질 발현 시스템을 제작하여 mammalian two-hybrid assay로 분석하고 있음

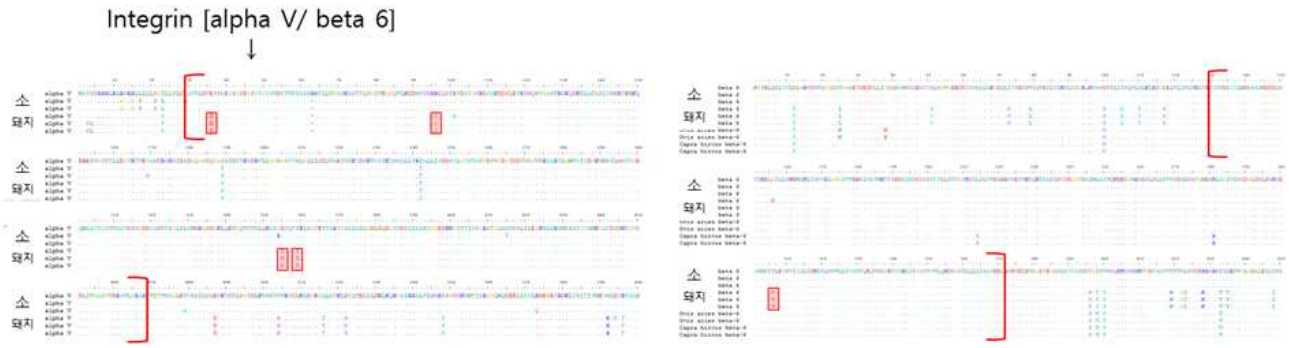


그림 65. FMDV VP1 단백질과 상호결합하는 소와 돼지세포의 integrin alpha5와 beta6 단백질 아미노산 변이 내용 분석

② FMDV CRE RNA와 결합하는 단백질로 동정된 PCBP2는 hepatitis C virus (HCV) 등의 다른 종류의 RNA 바이러스에서 상호작용하는 숙주세포 결합 단백지로 규명되었음. 아래 그림 66에서 소(Bos taurus)와 돼지(Sus scrofa)의 PCBP2 단백질을 구성하는 아미노산 변이 내용을 나타내었음. 돼지세포의 PCBP2에서 아미노산 위치 170에서 TLSQ 4개의 아미노산이 추가로 더 포함되어있음을 규명하였음. 이들 소와 돼지 각각의 다른 PCBP2를 다양한 용도의 plasmid에 클로닝하여 FMDV CRE RNA 와 3B 단백질과의 상호결합 변화에 대해서 연구를 진행하고 있음

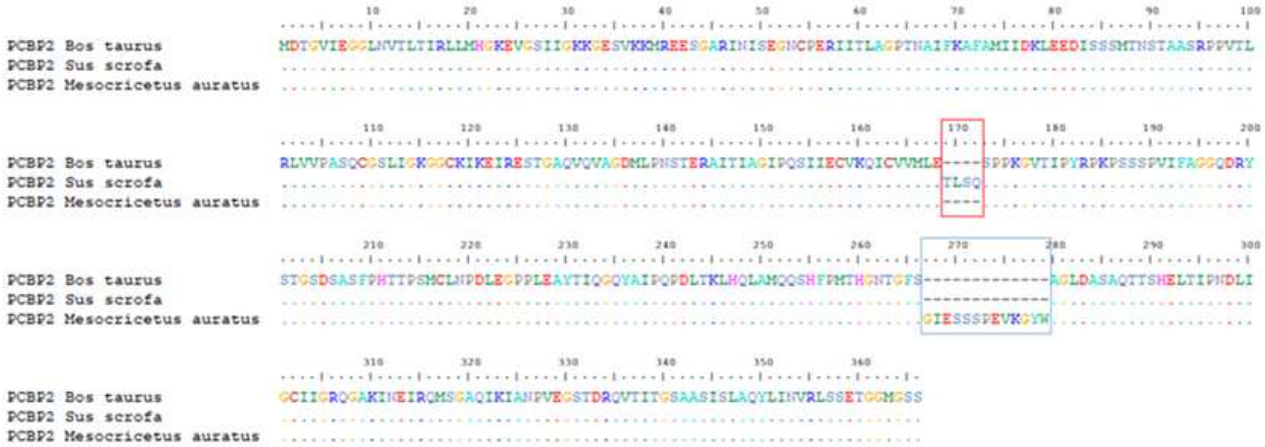


그림 66. 소와 돼지의 PCBP2 단백질의 아미노산 변이 내용 분석

③ FMDV VP1과 결합하는 숙주세포로서 동정된 occludin은 다른 종류의 돼지 감염 RNA 바이러스에서 바이러스 표면단백질과 결합하는 숙주세포의 세포막 단백질로 동정되었음. VP1에 대한 일차적인 숙주세포 수용체는 integrin alpha5/beta6 이지만, occludin은 이차적인 보조 역할을 할 가능성이 있음. occludin은 바이러스가 수용체가 결합한 후, receptor-mediated endocytosis 과정에서 기능할 수 있음. 그림 67에서 소와 돼지세포에서의 occludin 단백질의 nucleotides 변이 내용을 비교 분석하였음

그림 67. occludin DNA 염기서열. 소(bos taurus)와 돼지(sus scrofa) 숙주동물 occludin 유전자 염기변이 서열의 분석

- 그림 67에서 제시된 occludin nucleotides의 변이 내용을 단백질 아미노산으로 비교 분석하였음 (그림 68). 흥미롭게도 사람의 occludin 아미노산 구성은 돼지보다 소의 occludin 구성과 유사하였음. 그림 68의 네모칸으로 표시한 내용은 occludin의 숙주세포의 세포막 바깥으로 노

출된 extracellular domain 으로서 이 부분을 이용해서 FMDV VP1과 상호결합할 것으로 예상됨. 특히 ECL2로 표시된 아미노산 영역의 변이가 VP1 단백질 결합에 중요할 것임. 이들 아미노산 변이체를 함유한 occludin을 제작하여 VP1과의 상호결합 기능 변화 분석을 진행할 것임

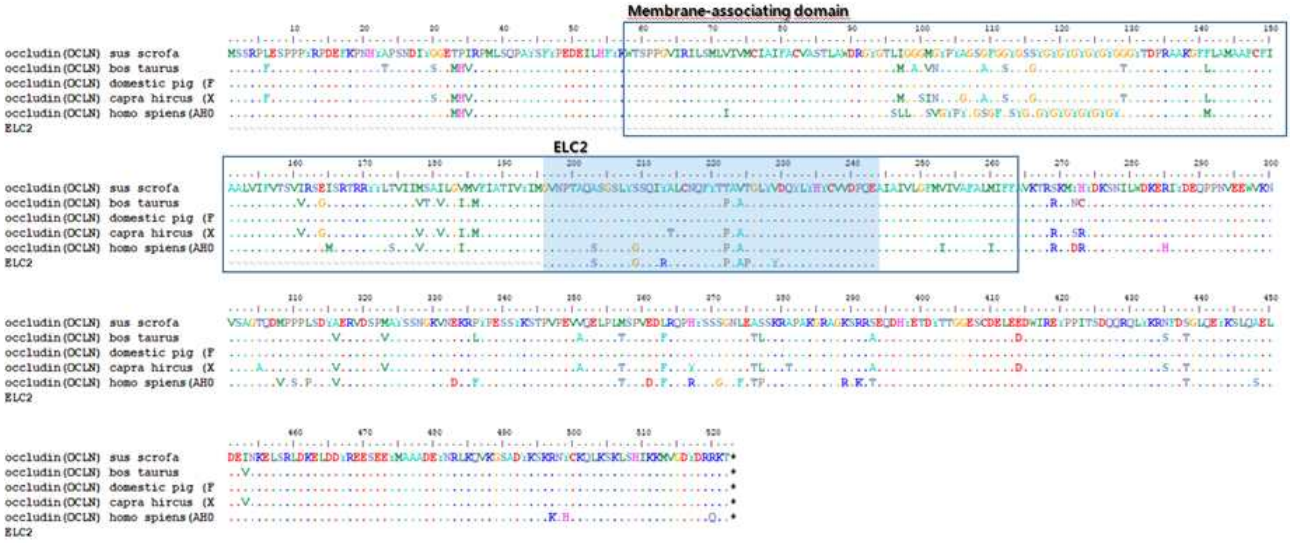


그림 68. FMDV VP1과 결합하는 occludin 단백질 부위 분석. 파란색으로 표시된 부위가 occludin의 extracellular loop 2개 중 2번째 loop에 해당함

④ FMDV 감염 돼지 조직에서 발현이 증가하는 것으로 확인된 chemokine 수용체인 CXCR5 유전자의 유전자 발현 조절 부위인 promoter의 nucleotides 변이 내용을 분석하였음. 그림 69에서 CXCR5 promote의 많은 부위에서 변이가 있음을 확인하였고 이 변이 부위에 특이적으로 반응하는 가능한 전사인자 후보군들을 탐색하였음

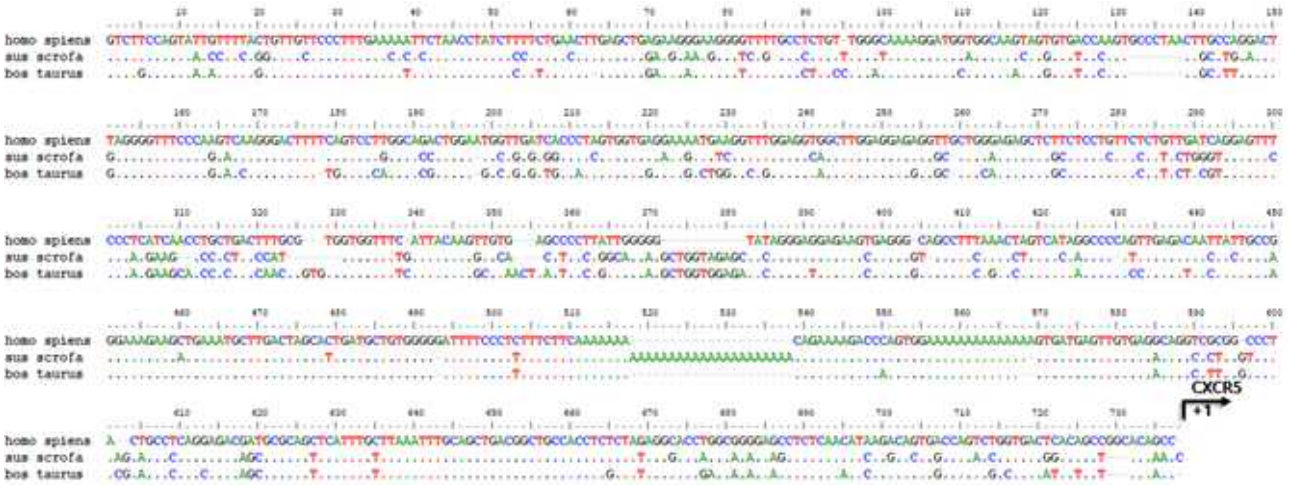


그림 69. 사람, 소, 돼지 CXCR5 유전자 프로모터 서열 비교분석

- 그림 70에서는 소와 돼지의 CXCR5 유전자의 promoter에 반응할 수 있는 전사인자들의 가능한 리스트들을 생물정보학 분석으로 탐색하였음. 공통으로 반응하는 전사인자들도 다수 있지만, 몇 개의 전사인자들은 소 또는 돼지의 다른 CXCR5 promoter 부위들에 차별적으로 반응할 수 있음을 제시하고 있음

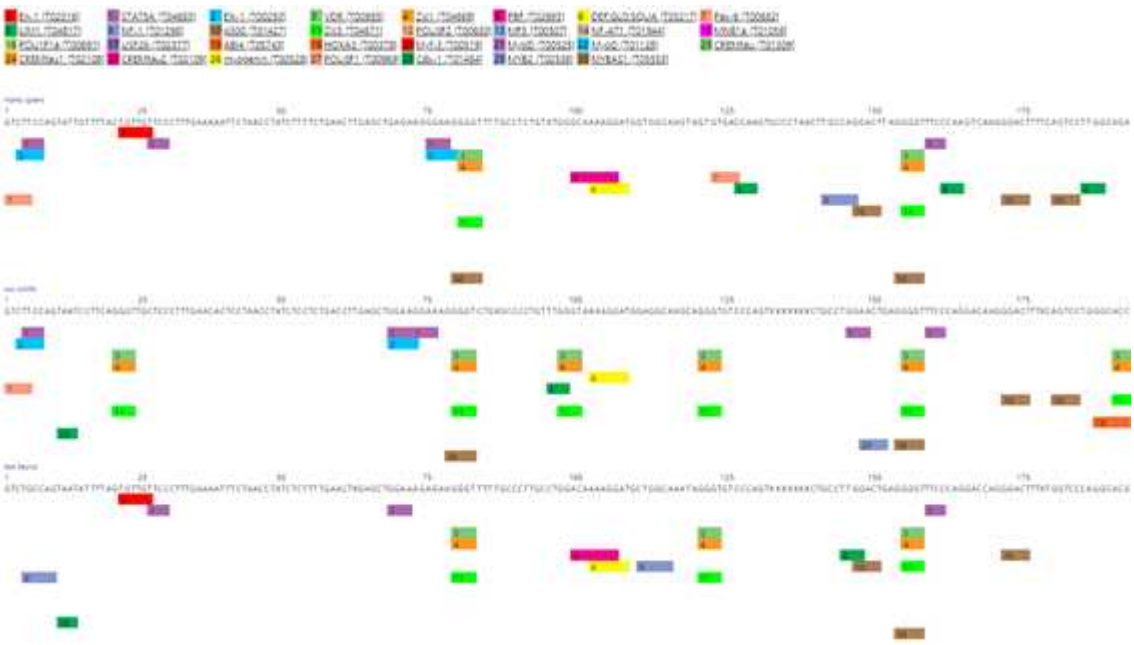


그림 70. CXCR5 promoter 서열 변이에 반응할 수 있는 전사인자들의 변화 패턴

2차년도 연구개발 내용

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 최종목표

○ 구제역 바이러스의 숙주별 감염 전파력(특성) 결정 인자 발굴 및 이를 바탕으로 하는 구제역 바이러스 전파 억제기술 개발 연구

- 바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴
- 숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴
- 전파력 인자들의 숙주별 특성 차이 비교 (20건 이상)
- 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 10건 이상 확보
- 전파력 인자 바이러스 변이주들 3종 이상의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 연구
- 구제역바이러스 전파력 결정 인자를 표적으로 하는 억제 물질 3건 이상 발굴

나. 세부목표

○ **구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 바이러스 인자 발굴 및 특성연구**

- **돼지와 소에서 구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 바이러스 인자 발굴 및 특성연구 (구제역바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴)**

♦ 구제역바이러스 2개 비단백질코딩 영역(non-coding element, CRE와 IRES)와 10개 바이러스 단백질들(VP1/VP3, L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D)의 변이 상황 분석

♦ 바이러스의 전파력 관련 기능을 5가지 단계(바이러스 entry, 바이러스 RNA 복제, 바이러스 단 백질 합성, 바이러스 입자 조립, 바이러스 세포외방출)로 구분하여 검토

- **구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 인자들의 숙주별(소, 돼지) 특성 비교 (숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴)**: 구제역바이러스 각 기능별 조절요소들과 상호작용하는 숙주별 세포 인자들의 염기/아미노산 변이 분석과 단백질 기능 특성 비교

- **구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 인자들과 반응하는 숙주(소, 돼지) 세포 혹은 단백질의 특성 연구 (숙주별 전파력 결정 인자 특성 차이 20건 이상)**: 숙주별 세포들에서 구제역바이러스 전파력 결정 인자 단백질들의 발현을 유도한 후 세포 이상과 단백질 기능 특성 분석

○ **전파능력 결정 인자 돌연변이 구제역 바이러스 제작 및 특성연구**

- **구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 인자들을 돌연변이 시킨 구제역바이러스 변이주 제작 (전파력 결정 인자 변이체들을 발현하는 구제역바이러스 변이주 10건 이상 제작)**: Asia1-Shamir 구제역바이러스주(많은 세포 계대배양을 거치지않고 바이러스를 생성해서 배출함을 확인)를 기본 틀로 이용하여 앞선 연구에서 도출된 전파력 결정 인자 단백질 변이체들 중 5개 이상의 바이러스 변이주를 제작

- **구제역바이러스 변이주의 숙주(돼지) 감염전파력 특성 및 비교연구** : 제작한 바이러스 변이주 3종 이상을 각각 3마리씩의 돼지동물모델에 감염실험을 수행하여 감염전파력을 비교

- **구제역바이러스 변이주의 숙주별(소, 돼지) 병원성 연구** : 바이러스 변이주 감염 돼지모델에서 4가지 이상의 조직에서 병원성 분석을 수행

○ **구제역 바이러스의 전파능력 결정 인자를 바탕으로 하는 바이러스 전파 억제기술 개발 연구와 활용방안 연구**

- 앞선 연구에서 도출된 전파력 결정 인자 단백질의 기능과 활성을 조절하는 억제물질을 분자생물학적 기전을 토대로 2종 이상 발굴

- 구제역바이러스 전파력 결정 인자들과 상호작용하는 숙주동물의 전파력 인자들의 발굴과 특성분석의 결과를 토대로 숙주 인자들의 발현 차이를 전파력 감수성 숙주동물을 선별하는 마커로 활용할 수 있는 방안 연구

다. 연차별 개발목표 및 내용

<당해년도>

○ **연구개발 목표** : (그림 71)

♦ 전파능력 결정 인자 돌연변이 구제역 바이러스 제작 및 특성 연구

♦ 전파능력 결정 인자를 바탕으로 하는 바이러스 전파 억제기술 개발 연구와 활용방안 연구

- 주관연구기관 (부산대학교) :

♦ 구제역바이러스 전파력 결정 인자 변이체를 발현하는 바이러스 변이주 제작

♦ 전파력 결정 인자의 기능을 조절하는 억제물질 발굴

♦ 바이러스 변이주 감염 돼지의 조직에서 전파력과 병원성 관련인자들의 발현 분석

♦ 바이러스와 숙주종별 전파력 결정인자들의 유전자 변이 분석을 통한 바이러스 숙주종 특이성 판별을 위한 분자마커의 활용방안 연구

- 참여기관 (농림축산검역본부) :

♦ 바이러스 변이주의 돼지 동물모델 감염 실험

♦ 돼지 감염 모델을 이용한 바이러스 전파력과 임상조직을 이용한 병원성 분석

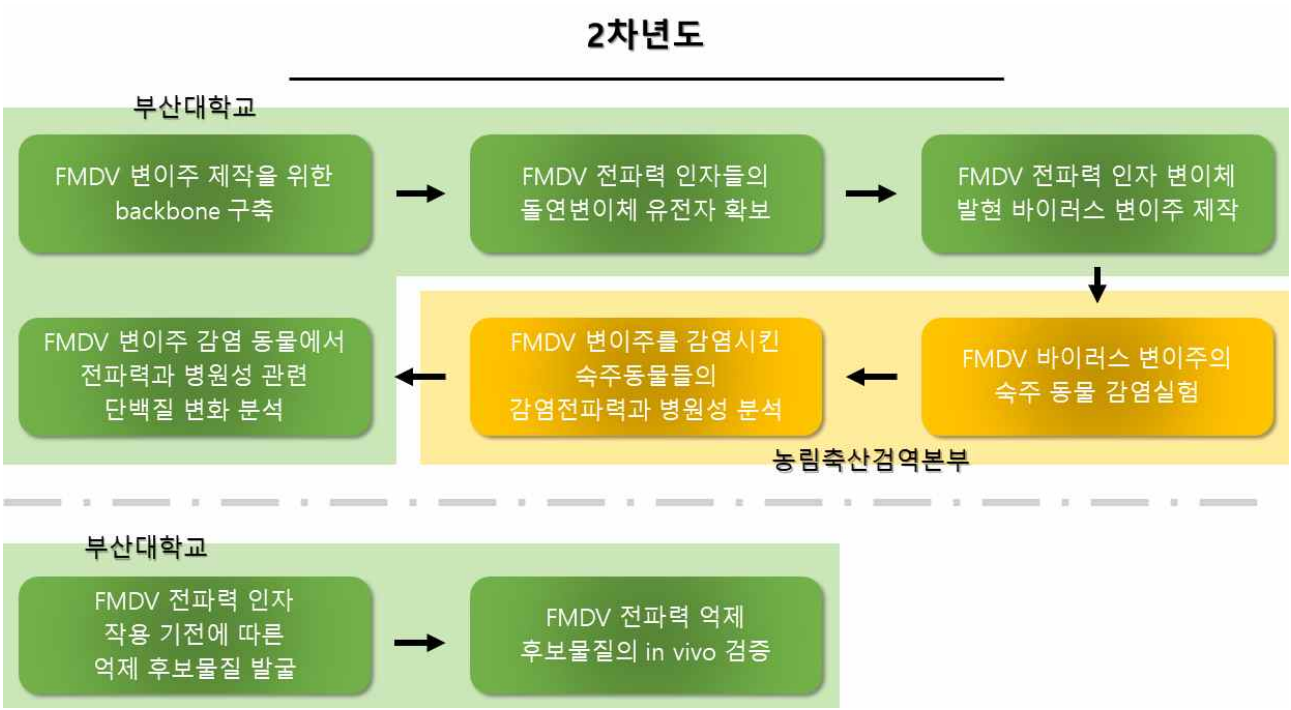


그림 71. 2차년도 연구개발 세부목표 모식도

1. 전파능력 결정 인자 돌연변이 구제역 바이러스 제작 및 특성연구

① 구제역 바이러스의 전파능력을 결정하는 인자들을 돌연변이 시킨 구제역바이러스 변이주 제작

○ 구제역바이러스 변이주를 제작하기 위한 바이러스 단백질 발현 시스템의 backbone 구축

- 구제역바이러스 변이주 제작에 사용할 계획인 백신주는 구제역백신연구센터의 자문을 얻어서 본 센터가 이용하고 있는 Asia1-Shamir 백신주임. 변이가 심하여 여러 가지 후보 백신주가 존재하는 다른 혈청형에 비해 Asia1형은 유전적 변이가 심하지 않은 것으로 알려져 있어 Shamir주만이 세계표준연구소에서 백신주로 추천받고 있음. 표1은 바이러스 변이주 제작에 이용한 Asia1/Shamir 바이러스주와 다른 구제역바이러스주들과의 유전자 유사성을 비교 분석한 결과임. 표2에 제시한 primer들을 이용하여 Asia1/Shamir 전장 게놈의 서열을 확보하였음

Position of genome	Nucleotides		Nucleotide similarity (%)			Amino acid similarity (%)		
			Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum	Average
	5' UTR	1,096	56.4	99.9	85.1	–	–	–
	L	601	86.0	100.0	87.9	91.5	100.0	95.1
P1	1A	255	85.1	91.4	89.4	58.8	75.3	69.6
	1B	654	86.2	92.4	89.2	64.2	78.0	71.9
	1C	657	86.7	91.8	89.9	63.2	76.8	71.8
	1D	627	54.9	100.0	74.5	54.5	76.8	67.3
P2	2A	54	83.3	94.4	91.3	66.7	88.9	83.6
	2B	462	91.9	95.1	93.8	80.8	86.5	84.4
	2C	954	89.9	93.9	92.6	73.3	84.0	80.2
P3	3A	459	75.9	93.5	91.4	67.3	83.0	78.7
	3B	141	91.5	96.5	94.0	76.6	89.4	84.3
	3C	711	90.3	99.9	91.7	73.4	79.3	77.4
	3D	1,415	91.3	100.0	93.2	77.5	83.4	81.8
	3' UTR	110	62.3	94.3	88.4	–	–	–

표 1. 다른 FMDV reference strain과 비교하여 유사한 Asia/Shamir 유전자 구성 분석

Primers	Direction	Position	Sequence (5'→3')
37F	Sense	37～57	CAACGACAGCTCCTGCATTG
947R	Anti-sense	927～947	CTTAGCCTGTCACCAGTGTC
220F	Sense	220～240	ACCTGGTCGTTAGCGCTGTC
710R	Anti-sense	685～710	TCTTTCCAGGTCTAGAGGGGTGACA
726F	Sense	726～746	ACTCCACGCTCGGTCCACTA
2289R	Anti-sense	2269～2289	ACAGCAGTCACCTCTATGTC
1984F	Sense	1984～2004	TGAAGACCGCATTCTCACCA
3925R	Anti-sense	3905～3925	TCCTGCCAACTTGAGTAGG
3635F	Sense	3635～3655	CGTGTGCTGGCAACAGTGTA
5674R	Anti-sense	5654～5674	CTTGTCATCCGTGGTGATGT
5411F	Sense	5411～5431	GGCCAACACGAAGCAGCAAT
7591R	Anti-sense	7571～7591	GATAATGCTTGTCGCGGAAC
7303F	Sense	7303～7323	AATTGGCTCGGCGGTCGGTT
5' RACE			GGGCACGCGTCGACTAGTACG
3' RACE			CTGTGAATGCTGCGACTACGAT

표 2. Asia1/Shamir 전장 게놈의 PCR을 위한 oligonucleotide primer 정보

- 구제역바이러스 변이주 제작을 위한 바이러스의 전파력 결정인자들의 아미노산 변이체 유전자 insert를 준비함. 국내 구제역 발생에서 획득한 바이러스의 유전자를 주형으로 하여 전파력 결정인자 유전자 insert를 증폭하여 vector에 클로닝하여 사용

- FMDV CRE RNA 서열은 그림 72과 같이 특징적인 RNA 2차구조를 형성함. 이 2차구조에 숙주세포와 바이러스의 복제관련 단백질들의 결합하여 바이러스 유전자 복제를 수행함. 1차년도의 연구결과에서 다양한 CRE 서열 변이에서 CRE RNA 2차구조에 변화를 주는 변이를 탐색하여 FMDV 변이주 제작에 활용하였음

- 그림 72에서 4개의 중요도가 높은 CRE 변이 중에서 T14G와 C42T에서 RNA 2차구조의 변화가 유도되기 때문에 FMDV 변이주 제작에 이 부위의 변환을 활용하였음

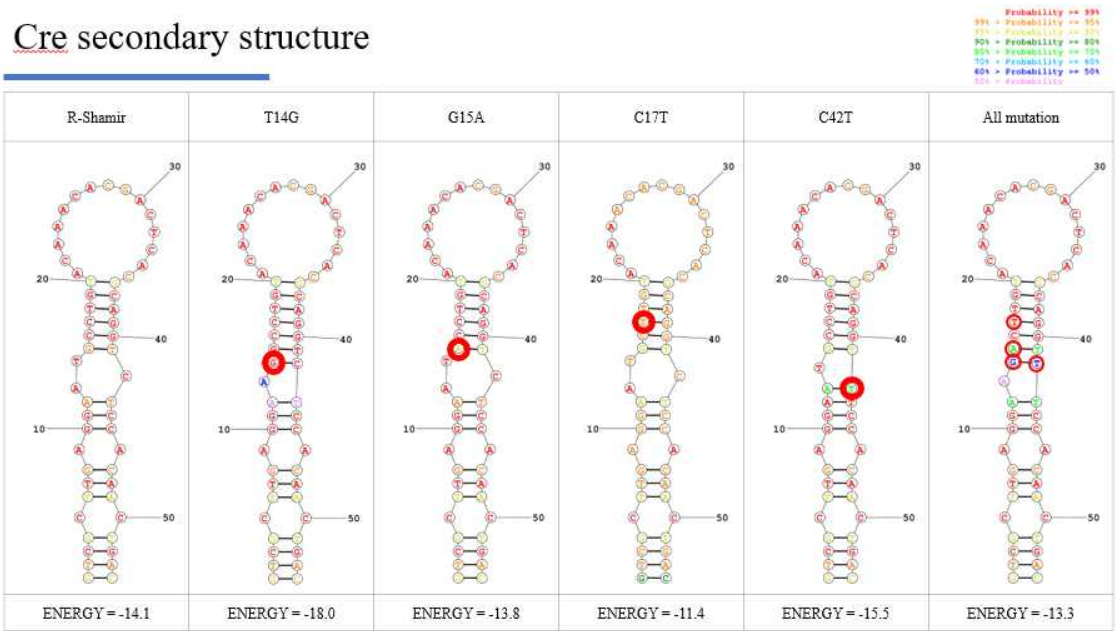


그림 72. FMDV 변이주 제작에 이용할 CRE RNA 변이 내용 분석

- 2C 단백질은 구제역바이러스의 유전자 복제에 필요한 환경을 조성하는데 필요한 기능을 수행함. 2C 단백질의 변이 내용에 따라서 구제역바이러스의 숙주세포 세포소기관인 소포체 항상성이 차이가 발생하고 이에 따라서 바이러스 복제 효율의 변동이 발생할 수 있음. 바이러스 변이주 backbone으로 이용한 Asai1/Shamir의 2C 단백질을 구성하는 아미노산과 국내 발생 바이러스의 변이 아미노산 내용을 비교 분석하여 가장 변이가 큰 아미노산을 선정하였음 (그림 73).

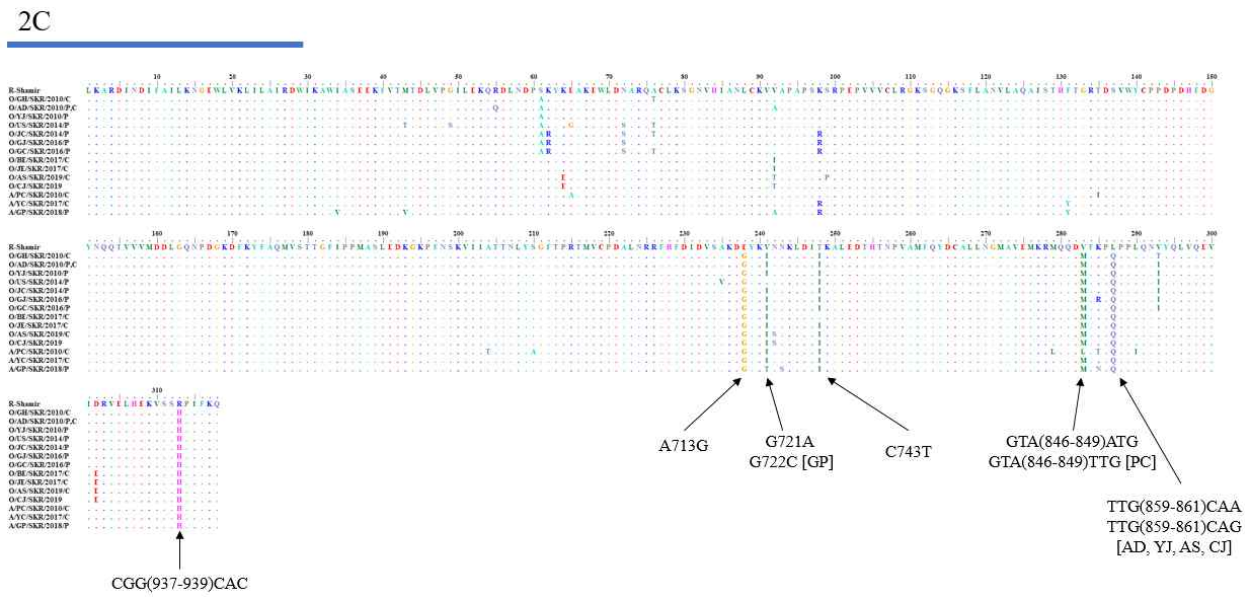


그림 73. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 2C 단백질의 아미노산 변이 선정

2C Hydropathy Score

	238	241	248	283	287	313
R-Shamir	-3.5	4.2	-0.7	4.2	3.8	-4.5
O/GH/SKR/2010/C	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/AD/SKR/2010	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/YJ/SKR/2010/P	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/US/SKR/2014/P	-0.4	4.2	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/JC/SKR/2014/P	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/GJ/SKR/2016/P	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/GC/SKR/2016/P	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/BE/SKR/2017/C	-0.4	4.5	-0.7	1.9	-3.5	-3.2
O/JE/SKR/2017/C	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/AS/SKR/2019	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
O/CJ/SKR/2019	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
A/PC/SKR/2010/C	-0.4	4.5	4.5	3.8	-3.5	-3.2
A/YC/SKR/2017/C	-0.4	4.5	4.5	1.9	-3.5	-3.2
A/GP/SKR/2018/P	-0.4	-0.7	4.5	1.9	-3.5	-3.2

그림 74. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 2C 단백질의 변이 아미노산들의 hydropathy index의 차이 분석

- 2C 단백질 유전자 변이를 함유한 바이러스 변이주를 제작하기 위한 2C 유전자 변이 정보를 그림 75에 정리하였음. 국내 발생 구제역바이러스의 변이 아미노산 내용을 참고하였음

➢ 2C

R-Shamir	location	South Korea	
		Sequence	strain
A	713	G	
GG	721-722	AG	
		AC	GP
C	743	T	
GTA	847-849	ATG	
		TTG	PC
TTG	859-861	CAA	
		CAG	AD, YJ, AS, CJ
CGG	937-939	CAC	

그림 75. FMDV 2C 단백질의 아미노산 변이 내용

- 3A 단백질의 특징은 다음과 같음
  - 153 아미노산으로 구성되며 다른 picornavirus들의 3A보다 큼(poliovirus의 3A는 87aa)
  - 구제역바이러스의 거의 모든 strain에서 유전자 변이가 적고 잘 보존되어있음. N-말단(1-75aa) 영역은 매우 잘 보존되어있는 반면, C-말단에는 많은 염기 돌연변이와 유전자 일부 영역의 결실이 존재
  - 소포체와 골지체에 위치
  - 3A·3AB 단백질 발현이 안정적으로 지속될 때 구제역바이러스 복제가 증가하지만, 3AB가 약하게 발현될 경우에는 바이러스 감염이 감소
  - 병원성과 숙주 종 결정에 관여함. Q44R의 경우에 기니아피그에 잘 감염되며, 자연적인 결실 변이체들 중에서 93-102(10aa) 결실(O/TAW/97)은 돼지에게 높은 병원성을 보이고, 소에게는 전염이 되지 않음. 87-106(20aa) 결실의 경우에는 바이러스 복제 능력이 감소하고 소에게서 병원성이 감소

- 그림 76에서도 대부분의 변이 아미노산은 C-말단에 집중되어있음. 특히 3A 단백질의 C-말단의 nucleotide 433-435 부위의 변이는 많은 국내 발생 구제역바이러스에서 나타나고 있으며, 아미노산 threonine이 proline으로 변경되어 단백질 구조에서도 큰 변화가 있을 것으로 예상됨. 이 변이 내용을 함유한 바이러스 변이주를 제작하였음 (그림 77).

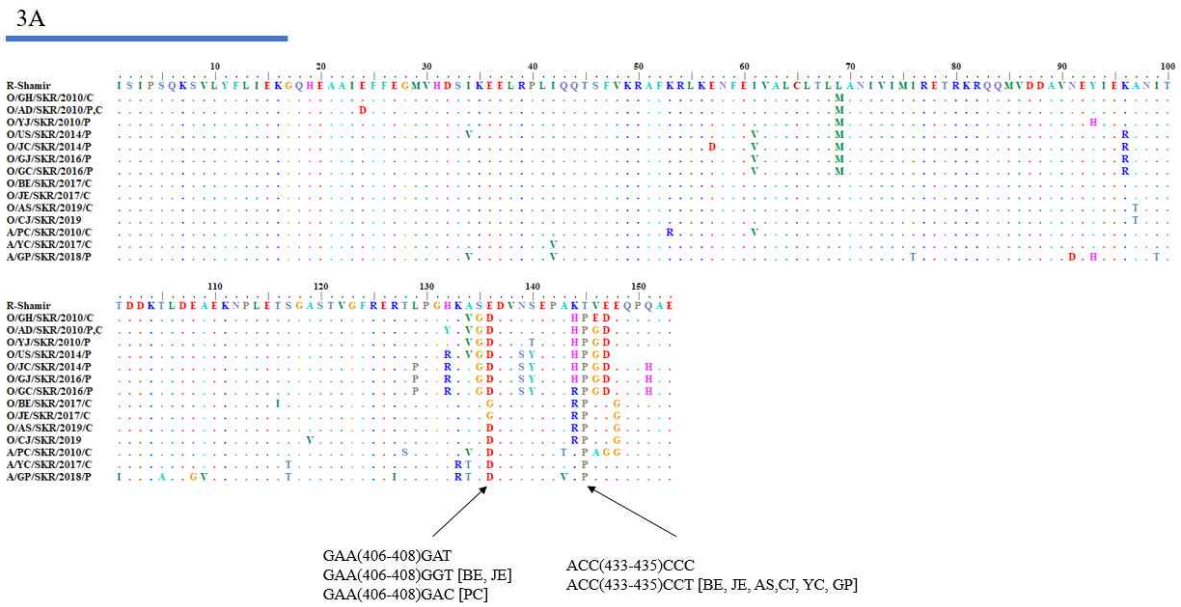


그림 76. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 3A 단백질의 아미노산 변이 선정

➢ 3A

R-Shamir	location	South Korea	
		Sequence	strain
GAA	406-408	GAT	
		GGT	BE, JE
		GAC	PC
ACC	433-435	CCC	
		CCT	BE, JE, AS, CJ, YC, GP

그림 77. FMDV 3A 단백질의 아미노산 변이 내용

- FMDV 변이 바이러스주 제작을 위해서 3A 단백질의 변이 아미노산들의 hydropathy index의 차이를 분석한 결과를 그림 78에 나타내었음. 3A 단백질의 아미노산 136 보다는 145번 위치의 threonine의 proline으로의 변경이 더 큰 hydropathy index 값을 보여주었음

3A Hydropathy Score

	136	145
R-Shamir	-3.5	-0.7
O/GH/SKR/2010/C	-3.5	-1.6
O/AD/SKR/2010	-3.5	-1.6
O/YJ/SKR/2010/P	-3.5	-1.6
O/US/SKR/2014/P	-3.5	-1.6
O/JC/SKR/2014/P	-3.5	-1.6
O/GJ/SKR/2016/P	-3.5	-1.6
O/GC/SKR/2016/P	-3.5	-1.6
O/BE/SKR/2017/C	-0.4	-1.6
O/JE/SKR/2017/C	-0.4	-1.6
O/AS/SKR/2019	-3.5	-1.6
O/CJ/SKR/2019	-3.5	-1.6
A/PC/SKR/2010/C	-3.5	-1.6
A/YC/SKR/2017/C	-3.5	-1.6
A/GP/SKR/2018/P	-3.5	-1.6

그림 78. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 3A 단백질의 변이 아미노산들의 hydropathy index의 차이

- 구제역바이러스의 RNA 게놈 복제에 관여하는 3D 단백질의 변이 상황을 지금까지 국내에서 발생한 구제역에서 획득한 바이러스 유전자 서열을 분석하여 정리한 결과를 그림 79에 나타내었음. 구제역바이러스 변이주를 제작할 때 이 정보들을 참고하여 변이체 제작에 포함될 아미노산 내용을 결정하였음

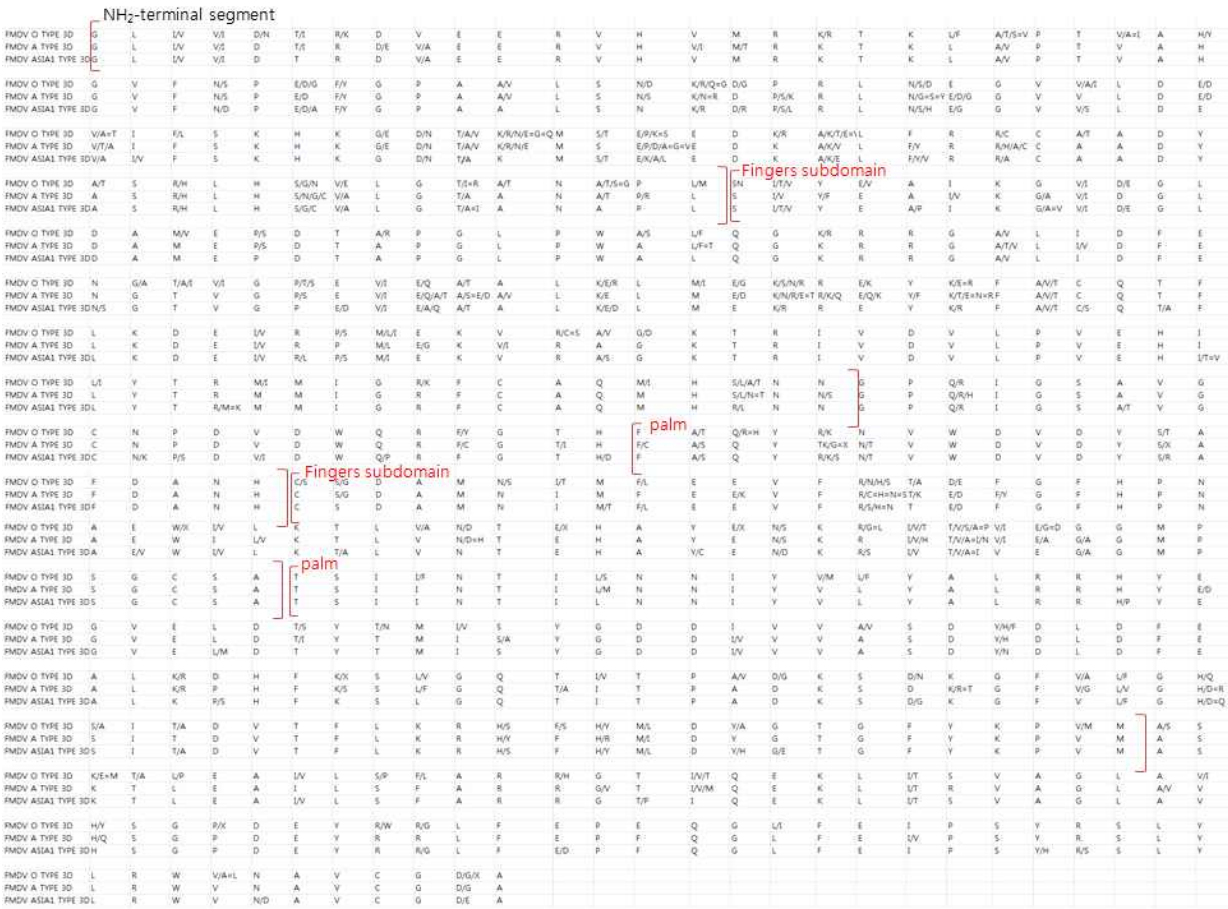


그림 79. FMDV 3D 단백질의 아미노산 변이 내용

- Shamir 바이러스주와 국내 발생 구제역바이러스 3D 단백질 아미노산의 변이 내용을 비교한 결과 몇 개 부위에서 특징적인 변이내용을 보이고 있음. 아미노산 위치로 33번, 47번, 231번, 288번 자리들이 주요 변이 부위임 (그림 80).

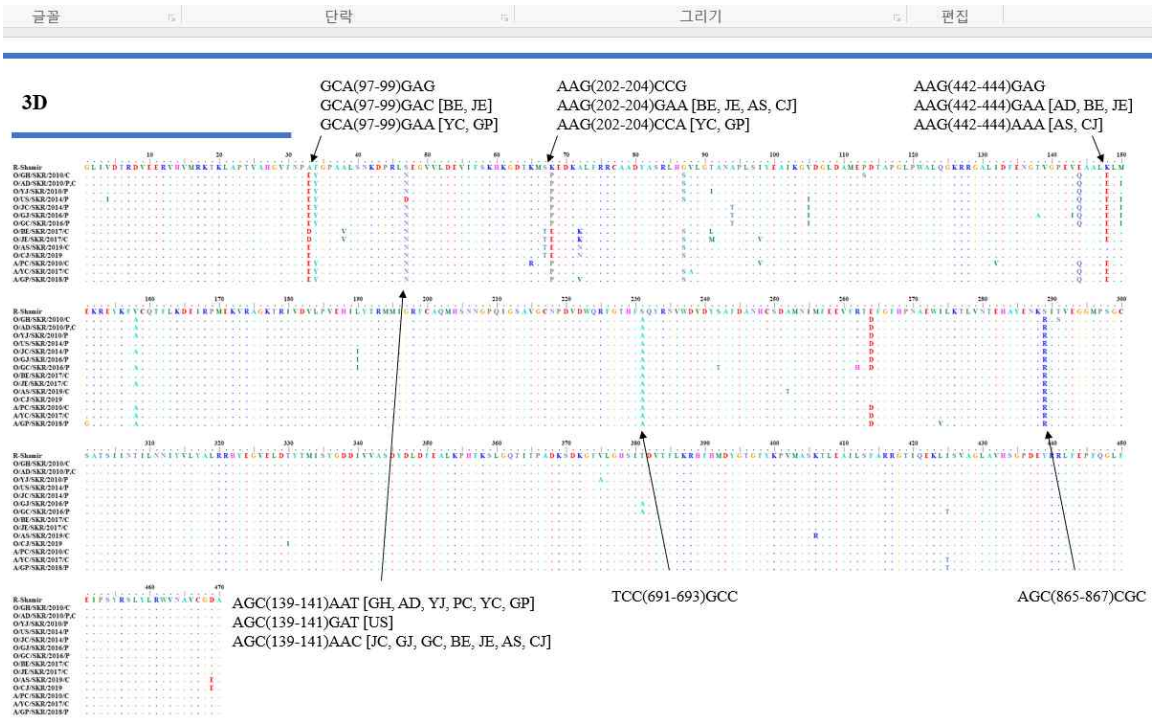


그림 80. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 3D 단백질의 아미노산 변이 선정

- 3D 단백질의 아미노산 33번, 47번, 231번, 288번 자리는 국내 발생 구제역바이러스의 주요 변이 자리와 일치함 (그림 81).

➢ 3D

R-Shamir	location	South Korea	
		Sequence	strain
GCA	97-99	GAG	
		GAC	BE, JE
		GGA	YC, GP
AGC	139-141	AAT	GH, AD, YJ, PC, YC, GP
		GAT	US
		AAC	JC, GJ, GC, BE, JE, AS, CJ
AAG	202-204	CCG	
		GAA	BE, JE, AS, CJ
		CCA	YC, GP
AAG	442-444	GAG	
		GAA	AD, BE, JE
		AAA	AS, CJ
TCC	691-693	GCC	
AGC	865-867	CGC	

그림 81. FMDV 3D 단백질의 아미노산 변이 내용

- FMDV 변이 바이러스주 제작을 위해서 3D 단백질의 변이 아미노산들의 hydropathy index의 차이를 분석한 결과를 그림 82에 나타내었음.

3D Hydropathy Score

	33	47	68	148	231	289
R-Shamir	1.8	-0.8	-3.9	-3.9	-0.8	-0.8
O/GH/SKR/2010/C	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/AD/SKR/2010	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/YJ/SKR/2010/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/US/SKR/2014/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/JC/SKR/2014/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/GJ/SKR/2016/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/GC/SKR/2016/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
O/BE/SKR/2017/C	-3.5	-3.5	-3.5	-3.5	1.8	-4.5
O/JE/SKR/2017/C	-3.5	-3.5	-3.5	-3.5	1.8	-4.5
O/AS/SKR/2019	-3.5	-3.5	-3.5	-3.9	1.8	-4.5
O/CJ/SKR/2019	-3.5	-3.5	-3.5	-3.9	1.8	-4.5
A/PC/SKR/2010/C	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
A/YC/SKR/2017/C	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5
A/GP/SKR/2018/P	-3.5	-3.5	-1.6	-3.5	1.8	-4.5

그림 82. FMDV 변이 바이러스주 제작을 위한 3D 단백질의 변이 아미노산들의 hydropathy index의 차이

- 3D 단백질을 구성하는 아미노산 부위 중에서 33번, 47번, 231번, 288번 변이 내용이 단백질 구조 변화에 영향이 클 것으로 예상됨. 3D 단백질 변이체로 기능변화 연구와 함께 바이러스 변이주 제작에 활용하였음

- 바이러스 변이주 제작은 그림 83의 총 11개 변이주 제작을 수행하였음. 크게 CRE 변이주 2개, 2C 단백질 변이주 4개, 3A 단백질 변이주 1개, 그리고 3D 단백질 변이주 4개임. 바이러스 변이주 제작은 농림축산검역본부 구제역백신연구센터에서 공동연구로 수행하였음

Region	NA	AA	R-Shamir 기준
Cre	T14G		T614G
	C42T		C642T
2C	C743T	T248I	C5151T
	TTG(859-861)CCA/CAG	L287Q	TTG(5267-5269)CCA/CAG
	A713G	E238G	
	GTA(846-849)ATG	V283M	
3A	ACC(433-435)CCC/CCT	T145P	ACC(5795-5797)CCC/CCT
3D	GCA(97-99)GAG/GAC/GAA	A33E/D	GCA(6770-6772)GAG/GAC/GAA
	AGC(865-867)CGC	S288R	
	AGC(139-141)AAC	S47N	AGC(7538-7540)CGC
	TCC(691-693)GCC	S231A	

그림 83. 구제역바이러스 변이주 11개 제작을 위한 변이 부위 선정

- 그림 84에 11개 구제역바이러스 변이주의 변이 내용을 모식도로 표현하였음

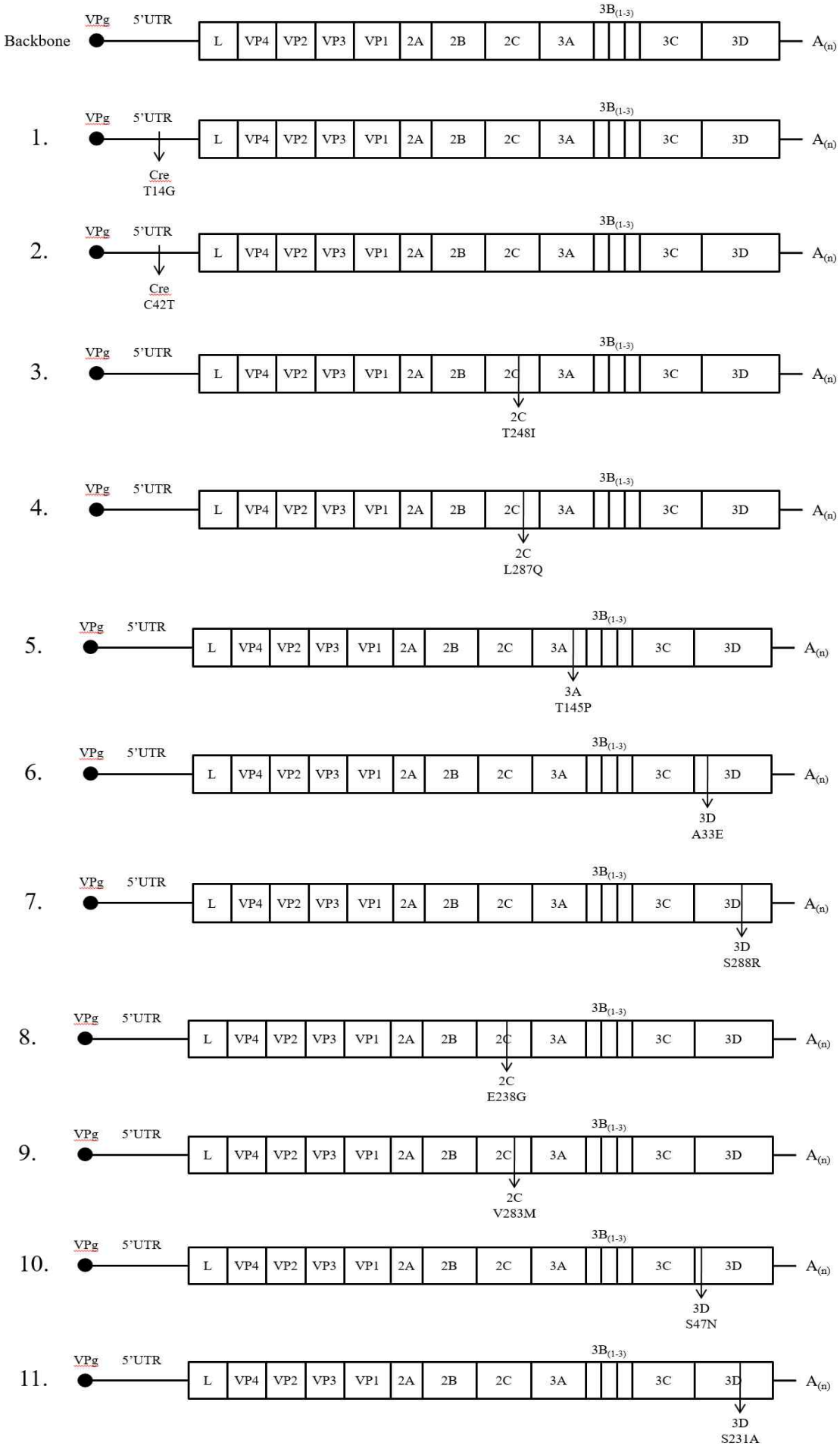


그림 84. FMDV(R-Shamir) 바이러스주를 backbone으로 활용하여 FMDV 바이러스 변이주 생성을 위한 FMDV(R-Shamir) backbone 변형

- 제작된 11개 구제역바이러스 변이주 중에서 7개 변이주를 우선적으로 돼지숙주세포에 감염실험을 수행하였음. 그림 83은 바이러스주 세포 감염 실험에 이용하였던 구제역바이러스 변이주들의 실제 유전자 변이 내용을 비교 분석한 결과임

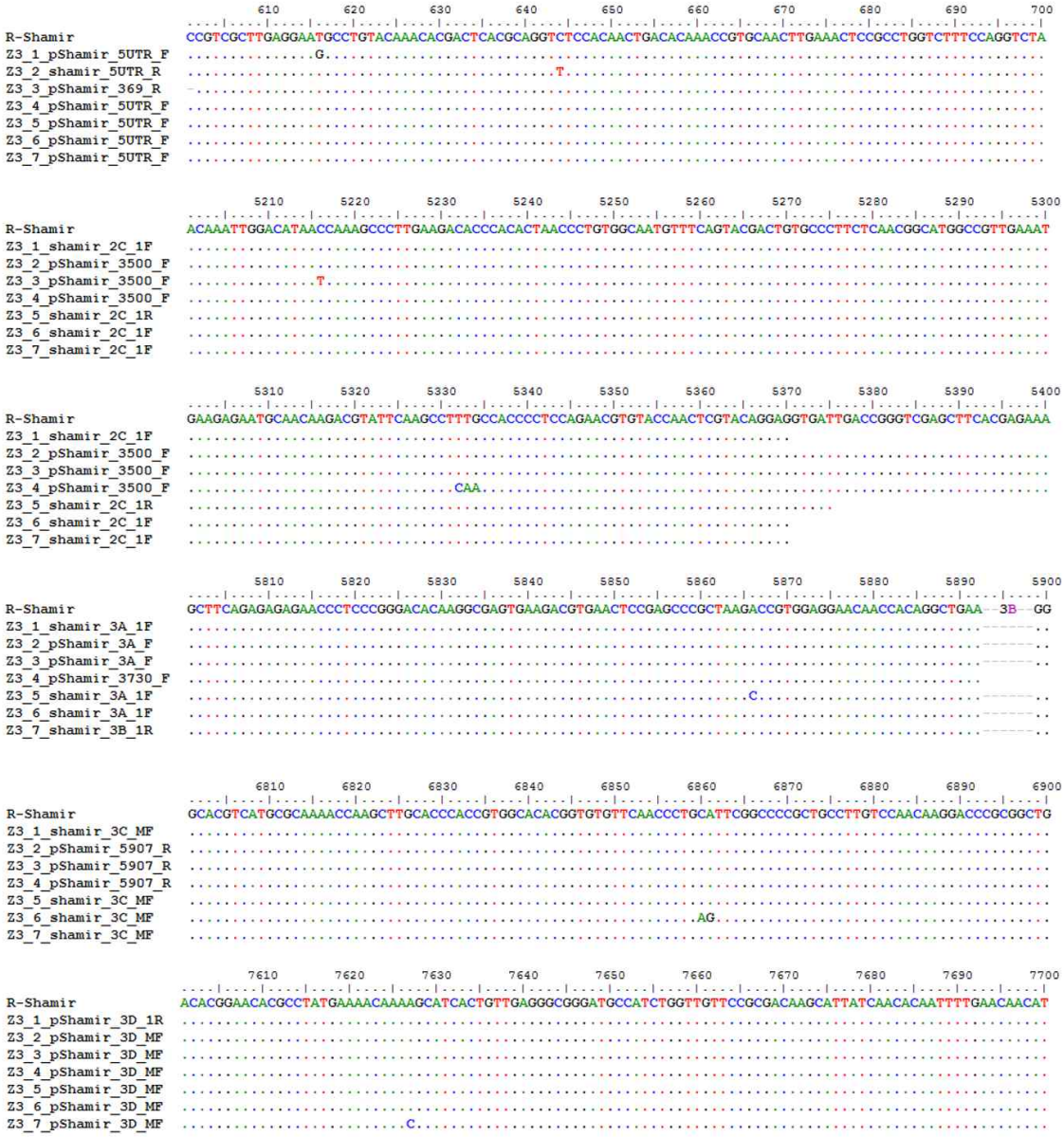


그림 85. FMDV(R-Shamir) 바이러스주를 backbone으로 활용하여 FMDV 바이러스 변이주 생성을 위한 FMDV(R-Shamir) 유전자 변이 설계

- 11개 제작한 구제역바이러스 변이주들 중에서 바이러스 증식능에 변화를 보일 수 있는 가능성이 큰 7개 구제역바이러스 변이주들을 돼지세포인 IBRS-2 세포에 감염시켜서 24 시간 후에 TCID50 값을 비교하였음. 결과로서 7번째 3D S288R 변이주가 가장 큰 TCID50/0.1ml $10.00x10^6$ 수치를 나타내며 바이러스 복제능력이 뛰어남을 보였음. 다음으로 2번째 Cre C42T와 4번째 2C L287Q는 높은 $5.00x10^6$ TCID50 값을 나타내었음 (그림 86).

Mutant	$TCID_{50}$/0.1ml
1 Cre T14G	$2.00*10^6$
2 Cre C42T	$5.00*10^6$
3 2C C248I	$2.50*10^6$
4 2C L287Q	$5.00*10^6$
5 3A T145P	$2.50*10^6$
6 3D A33E	$4.00*10^6$
7 3D S288R	$10.00*10^6$

그림 86. 7개 구제역바이러스 변이주들의 돼지세포 감염후 TCID50 비교 분석 결과

2. 구제역바이러스 변이주의 숙주별 감염병원성 특성 및 비교연구

- 구제역바이러스 변이주 3종 이상을 각각 3마리 이상의 돼지 감염 실험을 수행한 후 변이체 간의 감염병원성 정보를 비교분석함.

① 연구방법 및 수행전략

가. 재료

1. 실험재료 : 구제역바이러스 (Asia 1)
   Wild type Shamir 및 Shamir mutants 3종- Cre, 2C, 3D 부위
2. 실험동물 : 구제역 항원/항체 음성 SPF 미니돼지 20두
   병원성 실험용 약 8~12주령 그룹당 5마리씩 총 20두
3. 실험 시설이나 장비: BLS 3, ABSL 3 (농림축산검역본부), rRT-PCR 기기 등

나. 연구전략 및 방법

1. 제작한 전파력 결정인자 발현 Shamir mutants 7종 중에서 2, 4, 7, mutants를 선별하였고 이를 공유받아 돼지 감염 실험을 수행한 후 wild type 및 mutants 간의 전파력 정보를 비교 분석하였음

No.	Region	NA	AA	R-Shamir 기준
1	Cre	T14G		T614G
2	Cre	C42T		C642T
3	2C	C743T	T248I	C5151T
4	2C	TTG(859-861)CCA/CAG	L287Q	TTG(5267-5269)CCA/CAG
5	3A	ACC(433-435)CCC/CCT	T145P	ACC(5795-5797)CCC/CCT
6	3D	GCA(97-99)GAG/GAC/GAA	A33E/D	GCA(6770-6772)GAG/GAC/GAA
7	3D	AGC(865-867)CGC	S288R	AGC(7538-7540)CGC

* 유전자별 특성

- CRE : FMDV RNA genome 복제를 위한 priming 단계를 결정하는 주요 부위. 변이는 FMDV 복제 효율을 향상
- 2C : 소포체에서 FMDV 복제를 위한 replication complex 형성에 결정적 기능을 함 2C 변이는 FMDV 복제효율과 단백질 합성을 증가
- 3A : FMDV 병원성과 종 결정에 중요한 기능을 함. 3A 변이는 임상적 발생을 증가
- 3D : FMDV RNA genome을 직접 복제하는 효소로 기능. 3D 변이는 안정적인 바이러스 복제를 증가

2. 선발한 3종의 mutants와 wild type 바이러스를 이용하여 그룹별 5마리의 돼지에 10^5 $TCID_{50}$/ml의 바이러스 각각 25㎕씩 총 100㎕를 footpad에 접종하였음 (그림 87). 이후 10일 동안 임상적 특성을 분석함과 동시에 혈액 및 타액을 수집하였으며 이를 이용하여 병원성 분석을 하였음

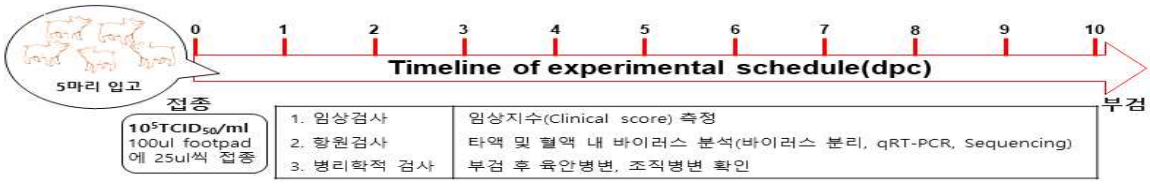


그림 87. 구제역바이러스 변이주 돼지 접종 감염 실험 타임라인

* 조사항목

- 임상지수(Clinical score)

< 임상지수 산출기준 >

(16점 만점 기준)

1) 발굽수포(전우, 전좌, 후우, 후좌) - 각 1점, 총 4점

2) 수포(혀, 잇몸(입), 주둥이(코 돌출부) - 각 1점, 총 3점

3) 제관염 - 열감 및 통증 1점, 발로 기립 못 함 2점, 총 2점

4) 보행 - 파행(걷지 못함) 1점, 주저앉음 1점 각 1점씩 총 2점

5) 사료섭취 - 식욕감소 1점, 사료 남김 및 사료섭취 못함 1점, 총 2점

6) 체온 - 40℃ 1점, 40.5℃ 2점, 41℃ 3점, 총 3점

*참고문헌: *J Comp Path* 2008. 138(204-14) 및 *J Virol* 2003. 77(13017-27)

- 바이러스양 : realtime RT-PCR(타액, 혈액)
- 항체검사 : SP/NSP ELISA법, 중화항체
- 부검 및 육안병변 확인

② 실험결과

1. 임상증상

모든 접종 군에서 1-9dpc 사이에 발열, 수포, 식욕감퇴, 파행 등의 임상증상을 나타내었음. Wild type 바이러스 접종 군은 mutants 접종 군에 비하여 1-2일 증상이 빠르게 나타남을 확인하였음. 또한 mutants 바이러스 접종군 중 7번 바이러스 접종군 (n=1)과 wild type 바이러스 접종 군에서 폐사 (n=1)가 있었음. 그중 wild type 바이러스 접종군의 폐사체의 경우 감염에 의한 것으로 밝혀졌음 (그림 88).

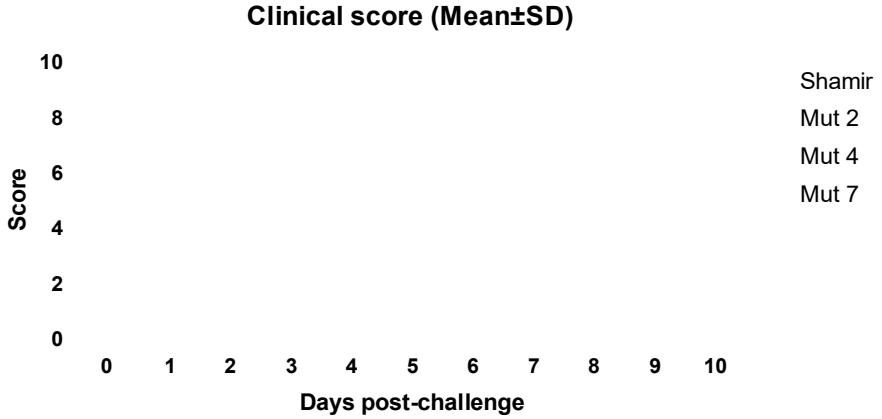


그림 88. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 임상증상 확인 분석

2. 바이러스양

1) 혈액 내 바이러스양

모든 접종군의 혈액 내 바이러스는 접종 후 6일간 검출되었고, 타액 내 바이러스보다 높은 양으로 존재하였음. Wild type 바이러스 접종 군은 2dpc에서 최대량(Ct value: 18.76)을 나타냈음. Mutants 바이러스 접종 군은 Wild type 바이러스 접종군 대비 검출시간이 지연되었고, 2-4dpc 사이에 최대량(Ct value: 21.56-33.56)으로 검출되었음. 한편, 7번 mutant 바이러스 접종 군에서 통계학적 유의성으로 감염초기에 다른 군에 비해 적은 양의 바이러스가 지속해서 검출되었음 (그림 89).

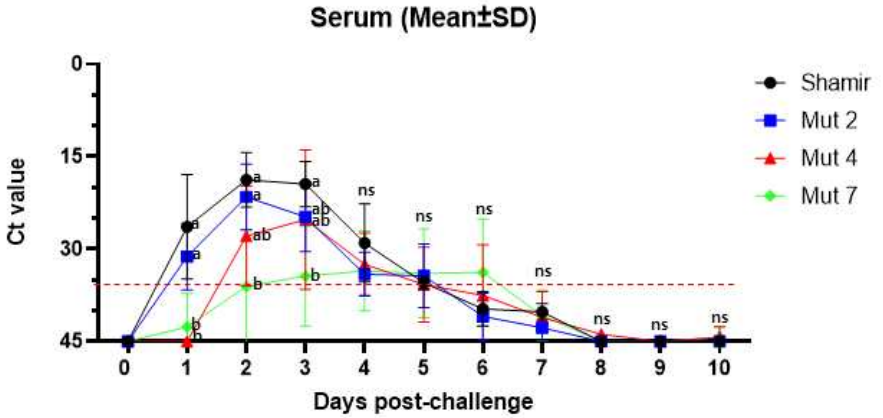


그림 89. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 혈액 내 바이러스 양 분석

2) 타액 내 바이러스 양

타액 내 바이러스는 1-9dpc사이에서 검출되었으며 Wild type 바이러스 접종 군과 2번 mutant 바이러스 접종 군이 2-3dpc에서 최대량(Ct value: 25.94-27.47)을 나타내어 유사한 양상을 나타냈음. 4, 7번 변이주 접종 군에서 통계학적 유의성으로 적은 양의 바이러스가 지속해서 검출되었음 (그림 90).

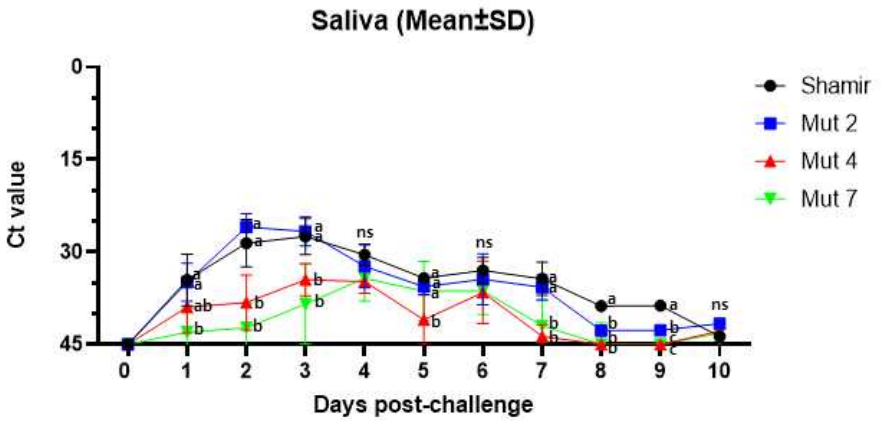


그림 90. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 타액 내 바이러스 양 분석

3. 항체가

1) SP Asia 1 ELISA

공격 접종 10dpc에 이전에 사망한 개체(100, 56)를 제외한 모든 접종군의 혈청시료를 10dpc에 채취하여 Asia1 혈청형에 대한 SP 항체를 진단하였음. 실험결과 모든 개체에서 Asia 1 혈청형에 대한 SP 항체가 양성으로 되어 모든 접종군에서 구제역의 구조단백질 특이 항체가 형성되었음을 알 수 있었음 (그림 91).

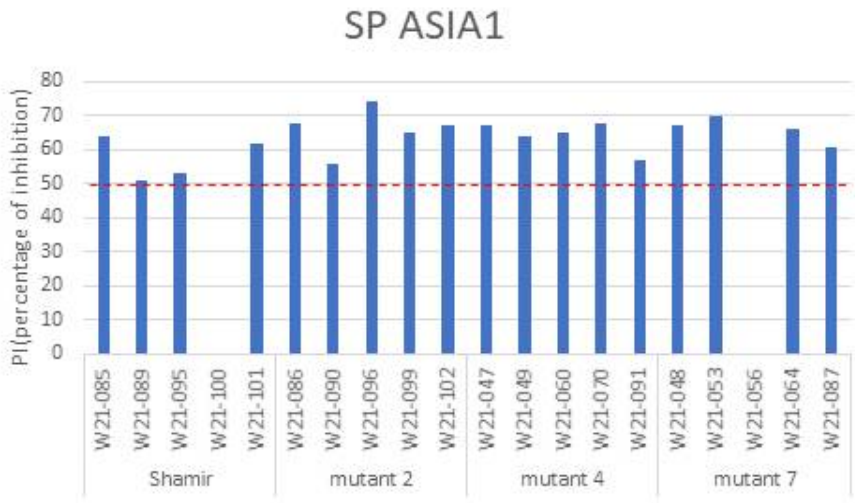


그림 91. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 항체가 형성 분석

2) 중화항체가

공격접종 10 dpc에 이전에 사망한 개체(100, 56)를 제외한 모든 접종군의 혈청시료를 10 dpc에 채취하여 wild type Shamir에 대한 중화항체가를 측정하였음. 실험결과 중화항체가가 2번 mutant 바이러스의 2개체에서 181, 그 외 모든 개체에서 256이상으로 검출되었고, 감염에 의한 구제역 특이 중화 항체가 형성되었음을 확인하였음 (그림 92).

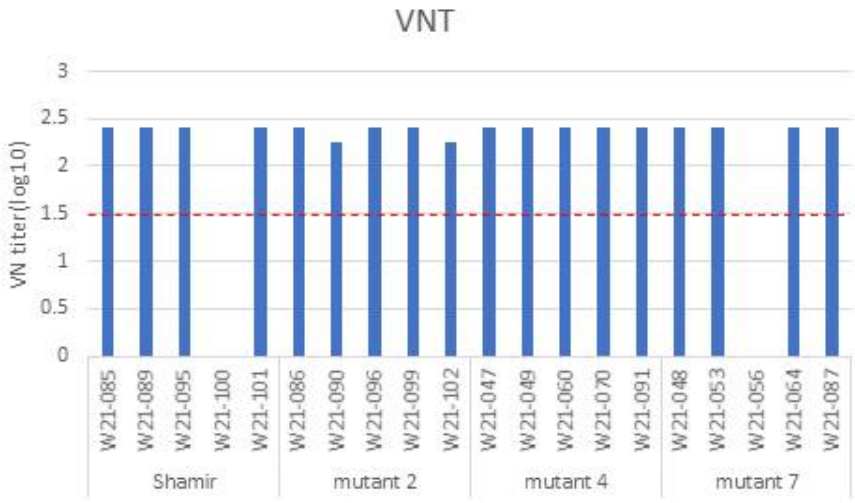


그림 92. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 중화항체가 형성 분석

3) NSP 항체가

공격 접종 10dpc에 이전에 사망한 개체(100, 56)를 제외한 모든 접종 군의 10 dpc 혈액 시료를 이용하여 NSP 항체가를 측정하였음. NSP는 Prionics 와 Median 두 가지 키트를 이용하여 NSP 항체를 진단하였음. 실험 결과, NSP 항체 양성 개체는 wild type shamir, 2번 mutant 바이러스, 4번 mutant 바이러스, 7번 mutant 바이러스에서 각각 3두, 4두, 3두, 3두로 확인하였음 (그림 93).

PrionicsNSP (+ >50)

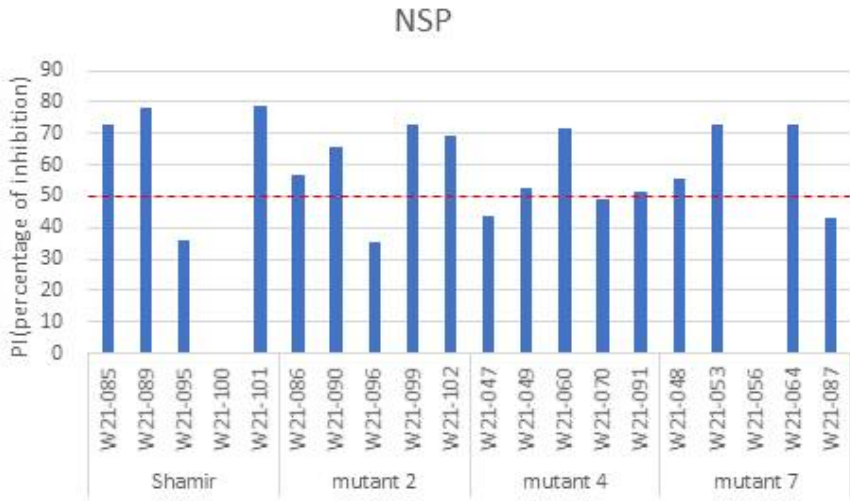


그림 93. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 NSP 항체가 형성 분석

4. 부검에 따른 육안적 병리 검사결과

바이러스를 접종 한 모든 돼지(20마리)의 부검 결과 특이한 육안적인 병리학적 소견은 확인할 수 없었음

③ 실험결과 요약 및 결론

가. 실험결과 요약

1. 모든 바이러스 접종 군에서 1-9pdc 사이에서 임상증상이 나타났다. wild type shamir 접종 군에서 다른 접종 군 대비 1-2일 증상이 빠르게 나타났다. 7번변이의 경우 감염초기에 병원성이 다소 낮게 나타났고, 4번과 7번 mutant virus 접종 군에서 다른 그룹에 비해 통계학적 유의성으로 적은 양의 바이러스가 혈액 및 타액에서 검출되었음.
2. 10dpc 이전에 사망한 개체(56, 100) 개체를 제외한 모든 접종군의 10dpc 혈액시료를 이용하였을 때 모든 개체에서 Asia 1 혈청형에 대한 SP 항체가 양성이었으며 감염에 의한 중화항체가도 2번 mutant 바이러스의 2개체에서 181, 그 외 모든 개체에서 256이상으로 검출되었고, 감염에 의한 구제역 특이 중화 항체가 형성되었음을 확인하였음. Prionics, Median 두 키트를 이용하여 NSP를 진단하였음. 사망한 개체(56, 100)을 제외한 18마리 중 Prionics kit는 13마리 양성, median kit는 15마리 양성임을 확인하였음. 군간에 차이는 확인할 수 없었음.
3. 육안적 부검 및 병리검사 결과는 wild type shamir 및 3개의 mutant 바이러스를 접종한 모든 그룹의 돼지에서 특이사항은 없었음.

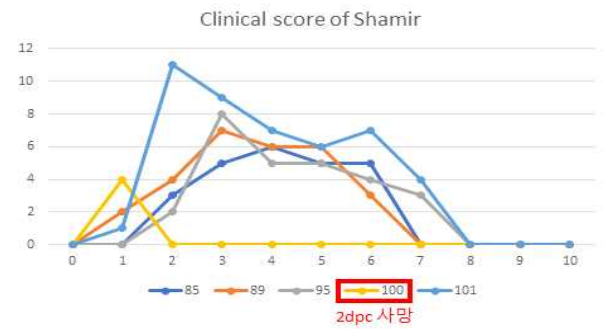
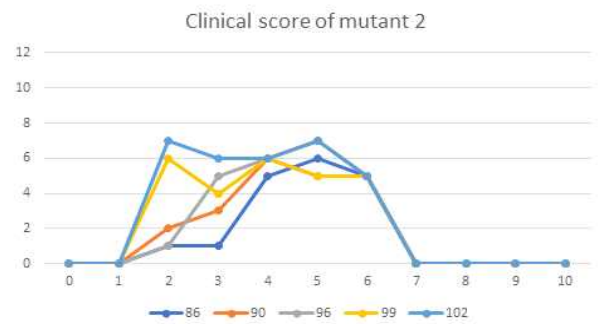
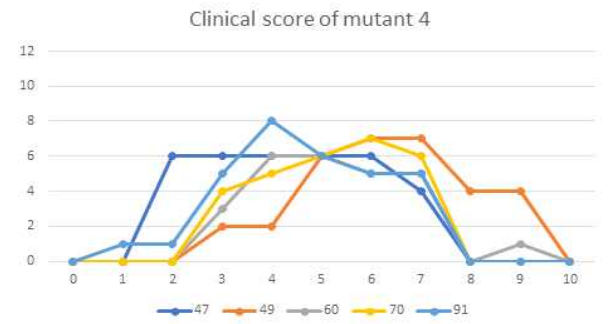
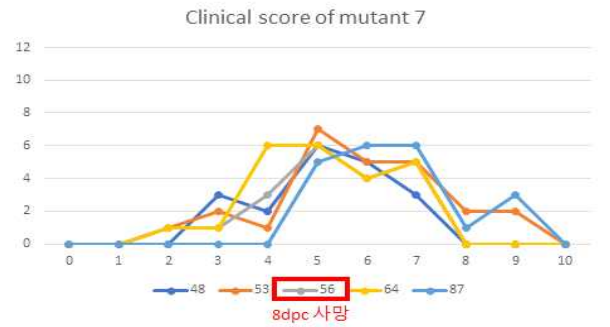
나. 결론

1. 전반적으로 병원성에서는 본 연구에서 유도한 변이는 병원성에 크게 영향을 주지 않았으나, 4번 7번 변이 바이러스는 전파력이 다소 낮아진 것으로 판단됨

2. 향후 국내에 큰 위협이 되고 있는 다른 혈청형 (O A 등)에 대한 변이의 영향에 대한 연구가 추가적으로 필요하며 이의 정보는 구제역의 효율적인 방역관리에 중요한 역할을 할 것으로 기대됨

<붙임> 개체별 결과

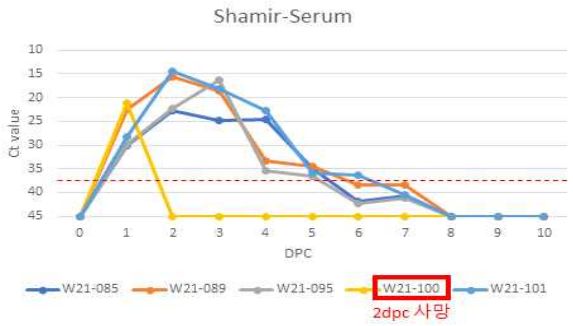
1. 임상증상

<table>
<tr><th colspan="2">임상증상- 개체별 결과</th></tr>
<tr><th>Wild type shamir</th><th>Mutant 2</th></tr>
<tr><td> 
</td><td> 
</td></tr>
<tr><th>Mutant 4</th><th>Mutant 7</th></tr>
<tr><td> 
</td><td> 
</td></tr>
</table>

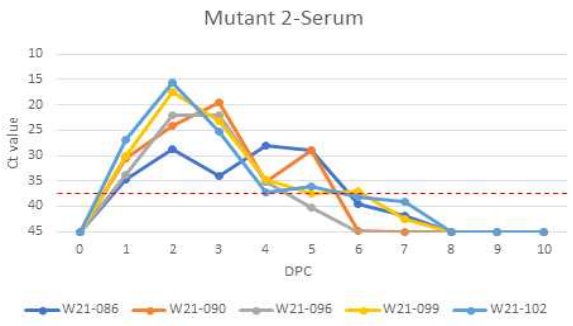
2. 바이러스 양

혈액 내 바이러스 양 - 개체별 결과

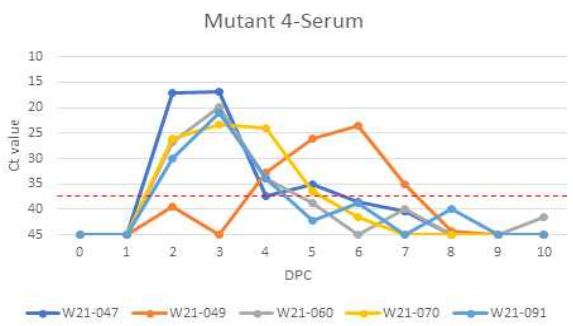
Wild type shamir



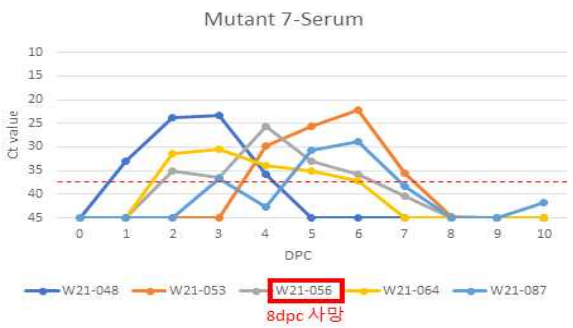
Mutant 2



Mutant 4

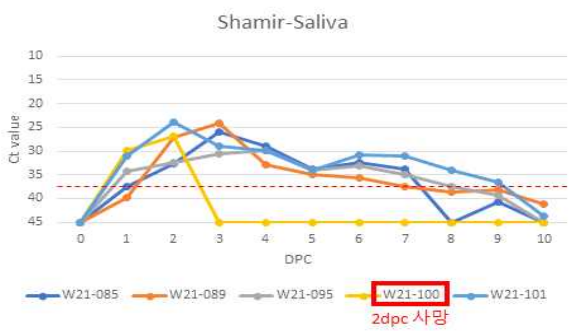


Mutant 7

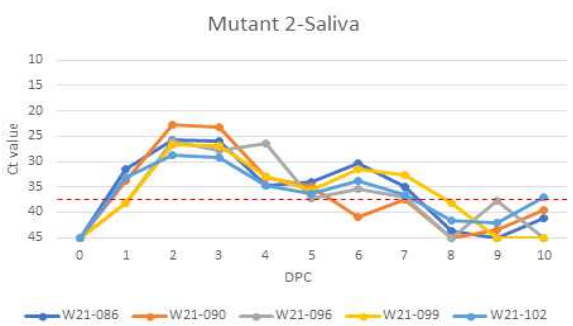


타액내 바이러스 양 - 개체별 결과

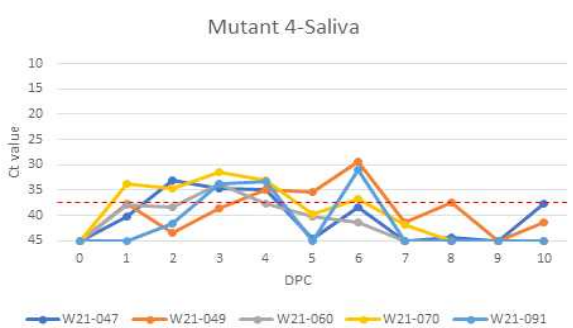
Wild type shamir



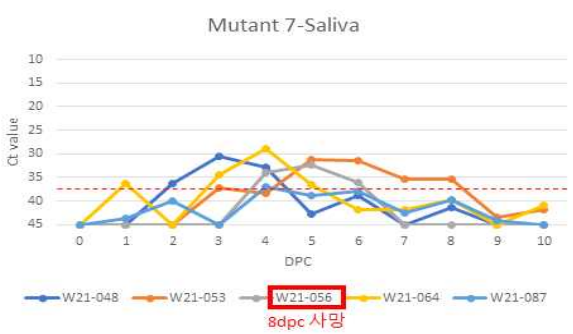
Mutant 2



Mutant 4

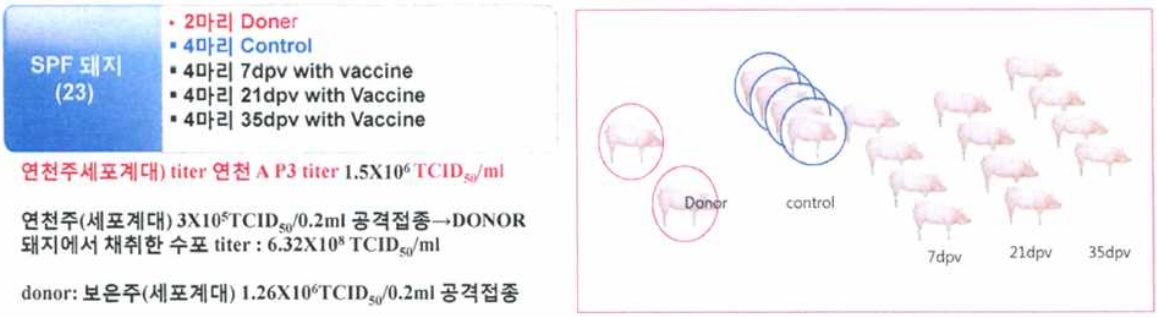


Mutant 7



3. 구제역바이러스 변이주의 돼지 감염병원성 관련 숙주인자 특성 연구

: 2017년 FMDV A 연천과 2018년 FMDV A 김포 바이러스 돼지 접종실험으로 숙주특정 단백질 특성 조사



- 농림축산검역본부에서 감염실험을 시행한 동물모델은 그림 92와 같음. 이 조직들에서 단백질 정제를 수행하였음. 조직에서 단백질을 분리하기 위하여 냉동 보관되어있던 조직 조각들에 protein lysis buffer를 첨가함. 쇠 bead를 이용하여 분쇄한 후 얼음에서 약 20분 동안 보관한 후 원심분리 12,000 rpm을 20분 동안 수행함. 상층액만 새로운 튜브에 옮겨서 단백질 발현 분석실험에 이용함

Virus 종	감염 종	개체 번호	장기
2017 A 연천	돼지	7	혀(정상)
			혀(병변)
			신장
2018 A 김포		244	혀(정상)
			혀(병변)
			신장
2018 A 김포		247	혀(정상)
			혀(병변)
			신장
2018 A 김포		250	혀(정상)
			혀(병변)
			신장
2018 A 김포		donor1	혀(정상)
			혀(병변)
			신장
2018 A 김포		donor4	혀(정상)
			혀(병변)
			신장

그림 94. 국내 발생 구제역바이러스 변이주의 돼지 감염 실험 및 조직 준비 상황

- FMDV 접종 돼지 실험에서 Clinical Score는 그림 95과 같은 기준으로 측정하고 분류하였음

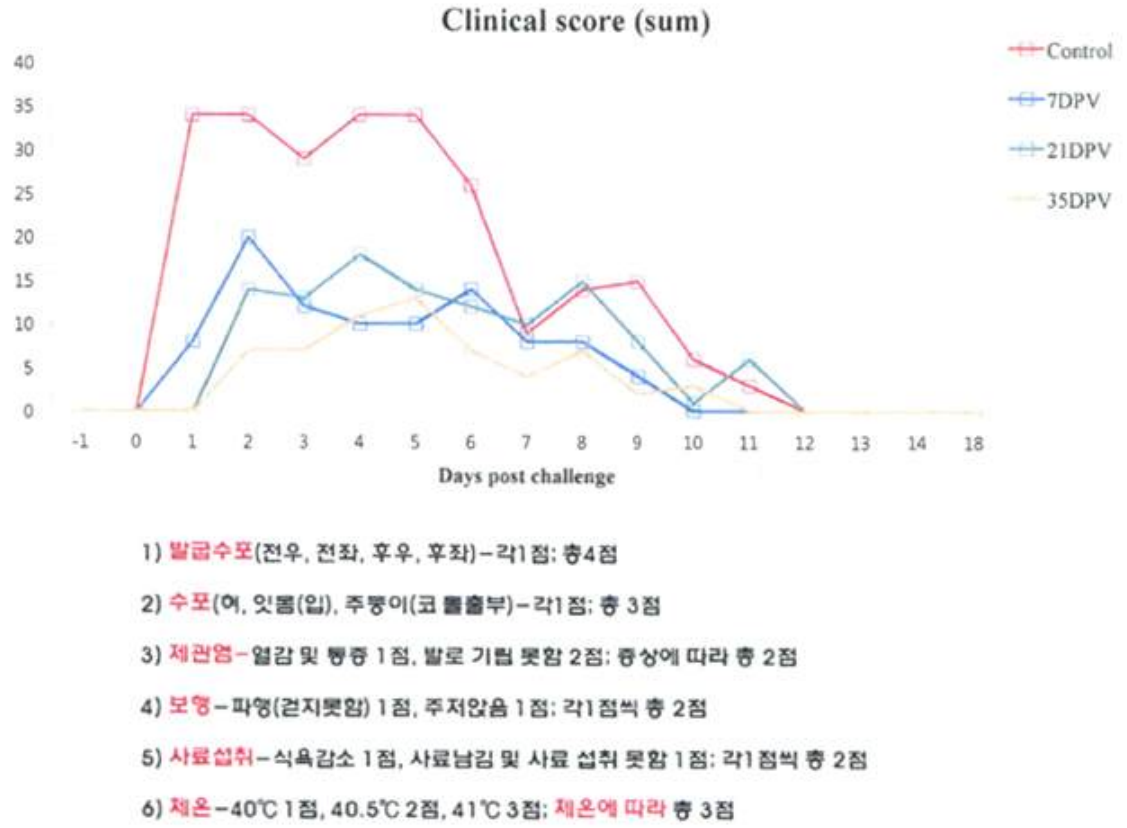
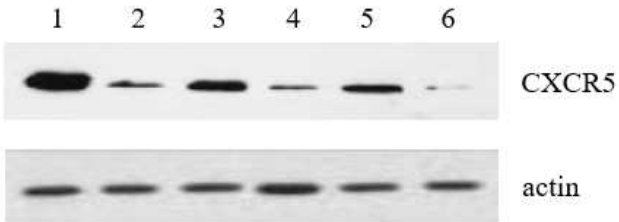


그림 95. 구제역바이러스의 돼지 접종 후 clinical score 분류 기준

- CXCR5 유전자의 발현 변화를 FMDV 돼지 접종 감염 조직을 이용하여 수행함. 그림 94에서 보듯이 3가지 다른 FMDV 감염 돼지 조직에서 단백질을 추출하여 Western blot 방법을 통해서 CXCR5 단백질 발현 차이를 확인함. CXCR5는 3가지 돼지 바이러스 접종 모델에서 병변이 확인된 혀조직에서 정상 조직에 비해서 3배 이상 단백질 생성이 증가함을 알 수 있었음



1 : 혀(병변), 2017 A 연천(no. 7)
2 : 혀(정상), 2017 A 연천(no. 7)
3 : 혀(병변), 2018 A 김포(no. 244)
4 : 혀(정상), 2018 A 김포(no. 244)
5 : 혀(병변), 2018 A 김포(no. 247)
6 : 혀(정상), 2018 A 김포(no. 247)

그림 96. FMDV A 바이러스 변이주를 접종한 돼지 임상 조직에서의 CXCR5 발현 변화 분석

- 2016년에 발표된 논문 (Transcriptomic analysis of persistent infection with FMDV in cattle suggests impairment of apoptosis and cell-mediated immunity in the nasopharynx, Plos One.; Eschbaumer et al.)에서 그림 97에서 보듯이, 다양한 면역 관련 유

전자들의 발현 증감이 관찰되었음. 이들 중에서 특히 chemokine과 chemokine receptor 단백질의 기능에 초점을 맞춤

Table 8. B-cell-related genes.

Gene	log_2 FC (NC/CR)	p	q	avg. signal
interleukin 21 (IL21)	-1.15	**<0.01**	**0.03**	78
interleukin 21 receptor (IL21R)	-1.15	**0.01**	**0.10**	1201
CD40 ligand, CD154 (CD40LG)	-0.52	**<0.011**	**0.048**	41
lymphotoxin alpha, tumor necrosis factor beta (LTA)	-1.20	**<0.01**	**0.05**	192
lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB)	-1.23	**<0.01**	**0.05**	1518
chemokine (C-X-C motif) receptor 5 (CXCR5)	-1.42	**0.01**	0.11	1503
chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13)	-1.53	**<0.01**	**0.04**	151
chemokine (C-C motif) receptor 7 (CCR7)	-1.02	**<0.01**	**0.06**	177
chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19)	-0.67	**<0.01**	**0.06**	60
chemokine (C-C motif) ligand 21 (CCL21)	-0.19	0.07	0.30	603
CD19 molecule (CD19)	-0.98	**<0.01**	**0.04**	94
membrane-spanning 4-domains, A1 (MS4A1), CD20	-1.34	**<0.01**	**0.08**	3209
complement component receptor 2 (CR2), CD21	-1.19	**0.01**	**0.09**	374
CD79b molecule (CD79B)	-1.14	**<0.011**	**0.05**	135
raftlin, lipid raft linker 1 (RFTN1)	-1.09	**<0.01**	**0.03**	1312
activation-induced cytidine deaminase (AICDA)	-1.44	**<0.01**	**0.05**	165
nuclear GTPase, germinal center associated (NUGGC)	-0.93	**<0.01**	**0.05**	59
regulator of G-protein signaling 13 (RGS13)	-1.40	**<0.01**	**0.05**	177

Negative log_2 FC values indicate higher expression in tissues from persistently infected FMDV carriers (CR) compared to non-carriers (NC). All p- and q-values that met the established significance criteria are marked in bold. (p: unadjusted p-value at gene level, q: transcriptome-wide p-value after Benjamini-Hochberg adjustment, avg. signal: average intensity of this probe across all arrays)

그림 97. FMDV 감염된 소에서 차별적으로 발현이 증가한 면역 관련 유전자들

- chemokine은 다양한 조직과 세포들에서 생성 분비되어 면역세포들을 특정한 조직으로 끌어들이는 역할을 수행함. 병원체를 제거하기 위하여 필요한 과정이지만, 과다하게 생성되어 필요 이상의 면역세포들이 존재하게 되면 염증반응을 일으켜 병리학적 증상을 유도하기도 함. 지금까지 다양한 chemokine과 chemokine receptor들이 여러 종류의 바이러스 감염과 밀접한 연관성이 있음이 발표되었음. 이들 결과를 토대로, FMDV 감염에서도 chemokine과 chemokine receptor들의 특이성이 숙주민감성을 나타내는 주요 조절인자로 기능할 가능성이 큼

- chemokine인 SDF-1은 면역세포를 강하게 이끄는 것으로 알려져 있음. 소와 돼지에서의 SDF-1의 유전자 변이 상황을 분석함. 그림 98은 유전자 nucleotide의 변이를 나타내었고, 그림 97은 SDF-1의 단백질 아미노산 차이를 보여주고 있음. 그림 97의 파란색 블록화된 부분은 SDF-1 receptor와 상호작용하는 영역임

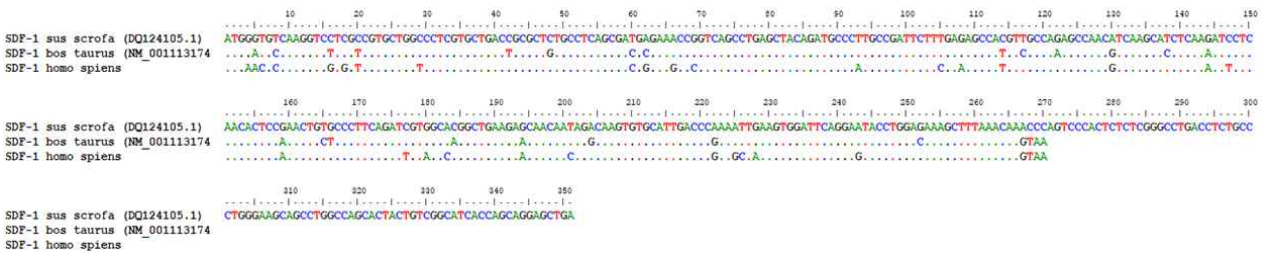


그림 98. 소와 돼지의 SDF-1 유전자 서열 비교 분석

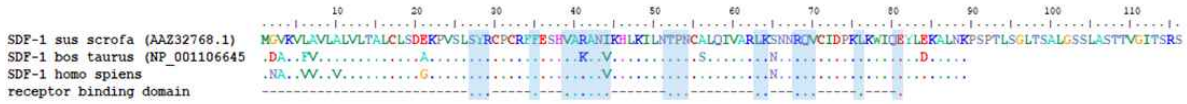
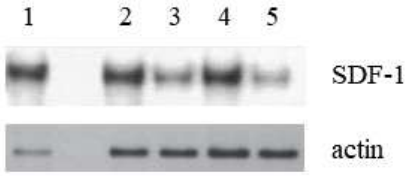


그림 99. 소와 돼지의 SDF-1 단백질 아미노산 서열 비교 분석

- 흥미롭게 그림 99의 3번째 파란색 블록 부분의 SDF-1 receptor 결합 부위에서 2개의 아미노산 변이 패턴이 소와 돼지에서 관찰됨. 이는 2개의 아미노산 차이가 다른 종류의 숙주동물의 반응 차이점을 결정할 수 있는 마커가 될 수 있음을 제시함. SDF-1의 발현 차이를 FMDV 바이러스 접종한 돼지 조직과 세포에서 확인하였음
- SDF-1 단백질은 2017 연천주와 2018 김포주에서 혀조직의 정상 부위보다 병변 부위에서 많이 발현됨을 확인하였음 (그림 100). 이는 SDF-1 인자가 많은 양의 비특이적 면역세포들을 바이러스 감염 부위로 유도하여 다량의 염증반응을 발생시킬 수 있는 가능성을 제시함



1 : positive control
2 : 혀(병변), 2017 A 연천(no. 7)
3 : 혀(정상), 2017 A 연천(no. 7)
4 : 혀(병변), 2018 A 김포(no. 244)
5 : 혀(정상), 2018 A 김포(no. 244)

그림 100. 구제역바이러스 돼지 접종 임상 조직에서의 SDF-1의 발현 변화

- 다음은 SDF-1 chemokine의 수용체인 CXCR5의 소와 돼지에서의 유전자 변이 특이성을 고찰함. 그림 101는 CXCR5 유전자 nucleotide를 소와 돼지에서 서로 비교한 결과임

그림 99. 소와 돼지의 CXCR5 유전자 서열 비교 분석

- CXCR5 유전자 서열 비교를 바탕으로 단백질의 아미노산 서열을 비교분석함. 그림 102에서는 소, 돼지, 염소, 그리고 사람의 CXCR5 아미노산 서열 차이를 보여주고 있음. 3개의 아미노산 위치에서 다른 3종과는 다르게 소에서만 함유한 아미노산이 있음. 돼지에서만 보이는 아미노산 변이도 관찰됨. 이들 특이 아미노산의 변이 패턴이 향후 숙주민감성의 마커 발굴의 가능성으로서 연구대상임

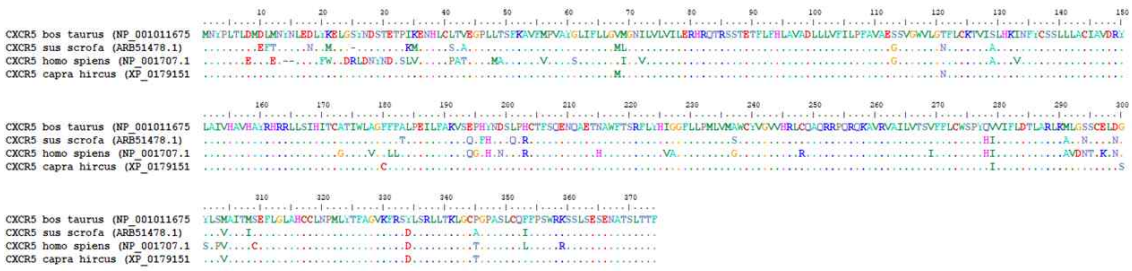


그림 102. 소와 돼지의 CXCR5 단백질 아미노산 서열 비교 분석

- CXCR5는 세포막을 관통하는 막단백질으로서 일반적인 7-transmembrane receptor 구조를 가지고 있음. 다음 그림 103에서 7개의 transmembrane domain으로 나타내고, 그 사이에 위치한 extracellular domain과 첫 번째 extracellular loop 영역의 변이에 초점을 맞추고 소와 돼지에서의 아미노산 변이 패턴을 분석함

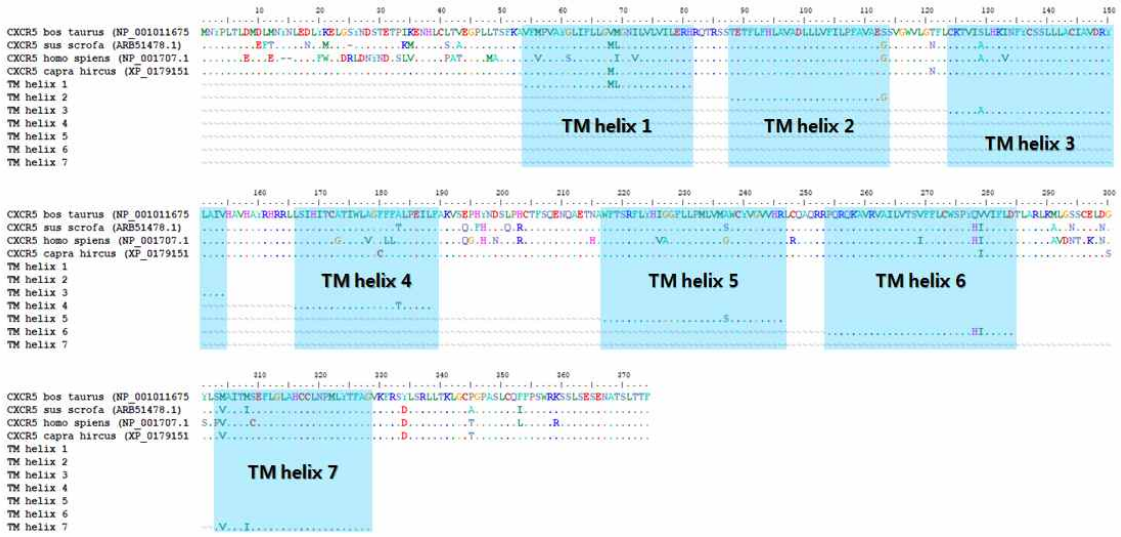


그림 103. CXCR5 단백질의 기능 도메인 부위 분석

- 그림 103에서 N 말단의 첫 번째 extracellular loop (#1 ~ 52)의 돼지에서만 관찰되는 아미노산 변이가 3개소가 있음. TM helix4와 TM helix5 사이의 3번째 extracellular loop 에서는 2개의 아미노산이, TM helix6와 TM helix7 사이의 4번째 extracellular loop은 돼지와 사람에게서만 일치하는 아미노산 변이가 3개소 있음. 이들 아미노산 변이의 기능적 의미를 향후 검토함

- CXCR5의 생성의 조절은 면역작용을 증가시킬 수도 있지만 과다하게 발현되는 경우 염증 등 병리학적 증상을 유도함. CXCR5의 생성이 FMDV의 지속적 감염시 증가하였기 때문에 CXCR5의 유전자 발현 조절 기전의 차이를 검토하는 것이 유용할 것임. 그림 104에서 사람, 소, 돼지 각각의 CXCR5 유전자의 발현 조절 부위인 프로모터를 전사시작부위에서부터 약 700 base 까지 비교분석함

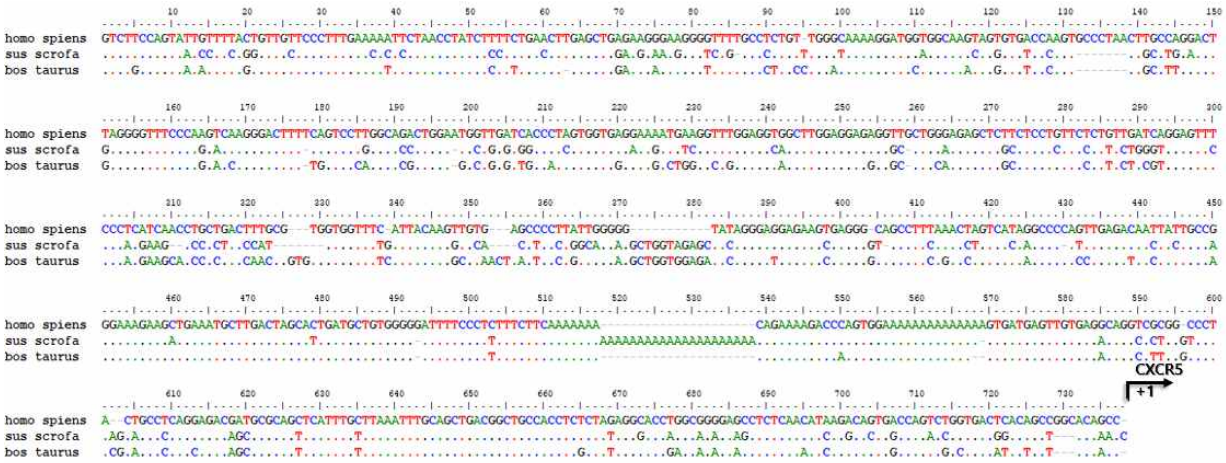


그림 104. 사람, 소, 돼지 CXCR5 유전자의 프로모터 서열 비교분석

- 그림 104에서 보듯이, 소와 돼지는 프로모터의 여러 부위에서 nucleotide 변이를 보이고 있음. 프로모터에서 하나의 nucleotide 변이는 이에 대응하는 특이 전사인자들의 반응의 변화를 유도함. 소와 돼지에서 CXCR5의 유전자 발현을 조절하는 전사인자들의 반응의 차이를 알아보기 위하여 지금까지 알려진 전사인자 반응서열의 데이터베이스를 이용하여 가능한 반응부위의 변화를 분석하였음 (그림 105).

그림 105. 사람, 소, 돼지의 CXCR5 promoter 서열 변이에 반응할 수 있는 전사인자들의 변화 패턴

- 그림 105에서 상단에 보이는 번호와 이름들은 CXCR5 promoter 각 영역에 반응하리라 예상되는 전사인자들임. 전사인자들은 각각 고유의 반응서열을 가지며 이 서열에 결합하여 CXCR5의 유전자 발현을 조절하게 됨. 그림 23에 보듯이, 사람/소/돼지에서 공통적으로 반응하는 전사인자의 반응서열도 가지지만, promoter 각 반응서열에서의 nucleotide의 변이는 이에 대응하는 전사인자의 종류도 바꾸게 함. 전사인자가 달라지면 환경변화에 대응하는 전사인자 활성화도 달라져서 CXCR5의 발현의 변화를 가져옴. 이는 결국 FMDV에 대한 면역조절인자의 변화와 더불어 숙주민감성과도 연관되어질 수 있음

4. 구제역 바이러스의 전파능력 결정 인자를 바탕으로 하는 바이러스 전파 억제기술 개발 연구와 활용방안 연구

1) 구제역바이러스의 전파력 결정인자의 기능을 억제하는 후보물질 발굴

- 기존의 RNA 바이러스들의 억제기술 개발은 주로 백신 개발과 바이러스 복제 억제물질의 발굴로 수행되었음. 본 과제에서는 1차년도에서 발굴된 구제역바이러스 전파력 결정 인자들의 기능과 연관한 후보억제물질을 발굴하는 실험을 진행하였음

① FGF11

- FGF11은 FGF 성장인자의 한 종류로서 다른 FGF 단백질들과는 달리 세포내에서 기능을 하는 것으로 알려져 있음. 앞선 연구에서 fibroblast growth factor 11 (FGF11)은 B형간염바이러스의 유전자 발현을 억제함으로 규명하였음. 이를 토대로 FGF11이 FMDV 복제에 필요한 유전자 발현을 억제할 수 있는지를 조사하였음. 우선 FMDV의 복제와 단백질 생성에 미치는 영향을 정량적으로 비교분석하기 위하여 그림 104와 같은 시스템을 제작하였음. FMDV 바이러스 변이주인 R-shamir의 5'UTR을 발광 유전자인 luciferase 앞부분에 삽입하여, 구제역 바이러스의 복제와 번역이 조절됨을 luciferase의 발현에 의한 형광 생성의 정도로 간접적으로 확인할 수 있음.

-

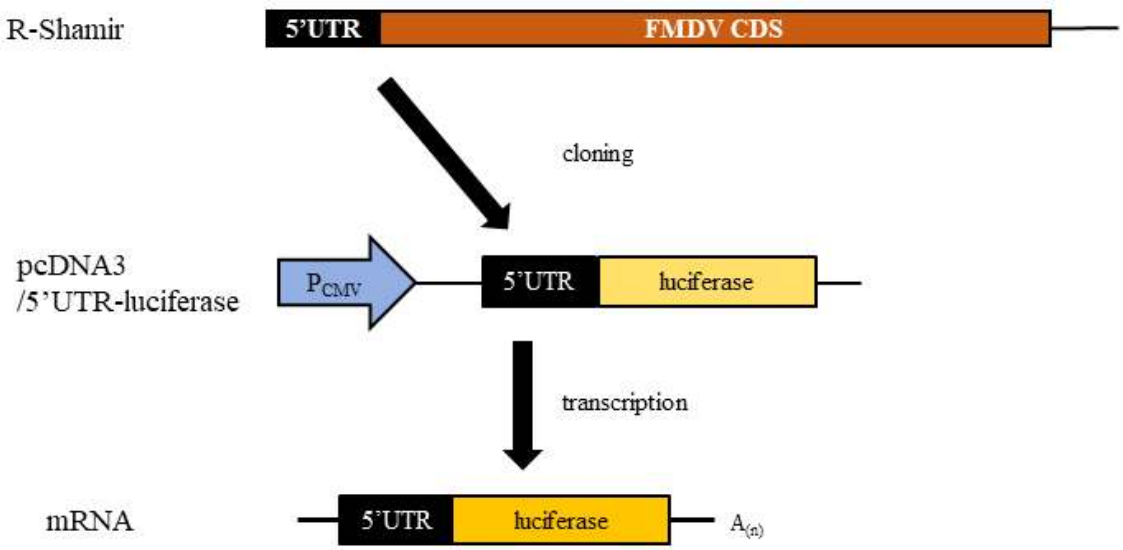


그림 106. FMDV 5'UTR 유전자 발현 조절을 정량적으로 분석하기 위한 recombinant reporter construct (FMDV 5'UTR-luci) 구축

- 구제역바이러스가 감염되는 돼지숙주세포주인 IBRS-2 세포에 그림 106의 FMDV 5'UTR repoter를 transfection하고 동시에 flag-FGF11 expression plasmid를 co-transfection 시킨 후 세포 내에서 FGF11이 발현 정도를 조사하였음. 그림 107에서 flag-FGF11의 transfection 도입 양에 비례하여 FGF11 단백질의 발현이 증가함을 확인하였음. FGF11의 발현이 IBRS-2 숙주세포의 cell viability에는 영향을 주지 않음을 추가로 확인하였음 (그림 107).

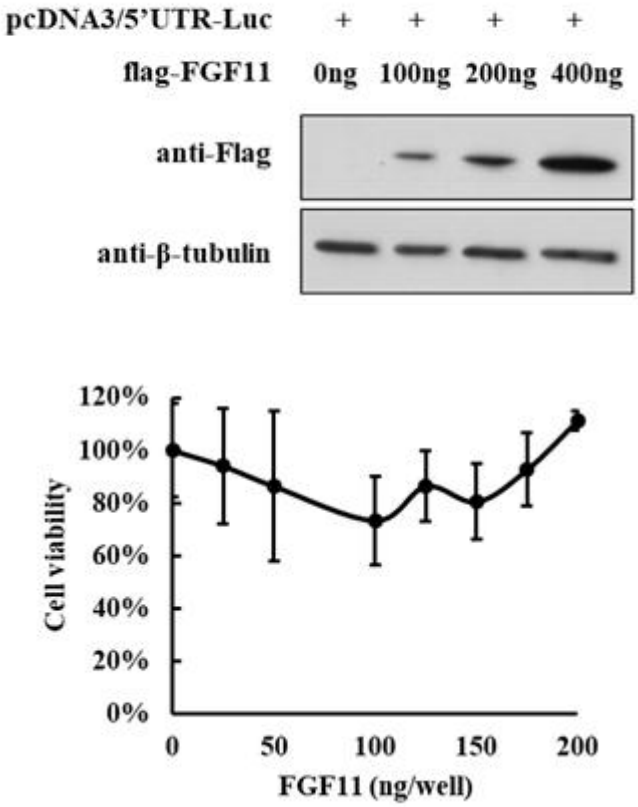


그림 107. FMDV 5'UTR-luciferase 레포터 발현 시스템을 이용한 FGF11의 FMDV 유전자 발현 억제 효과 분석에서 FGF11 유전자의 transfection에 의한 FGF11 단백질 발현양의 검증

- FMDV 5'UTR-luci 시스템과 함께 FGF11 발현 플라스미드를 FMDV의 숙주세포인 돼지세포 IBRS-2 세포에 transfection(유전자 도입)한 다음, FMDV 5'UTR 발현 조절 정도를 luciferase 활성을 측정하여 비교분석하였음. FGF11의 다양한 발현양을 적용하였을 때, FGF11의 발현양 의존적으로 FMDV 유전자 발현이 감소함을 확인하였음 (그림 108).

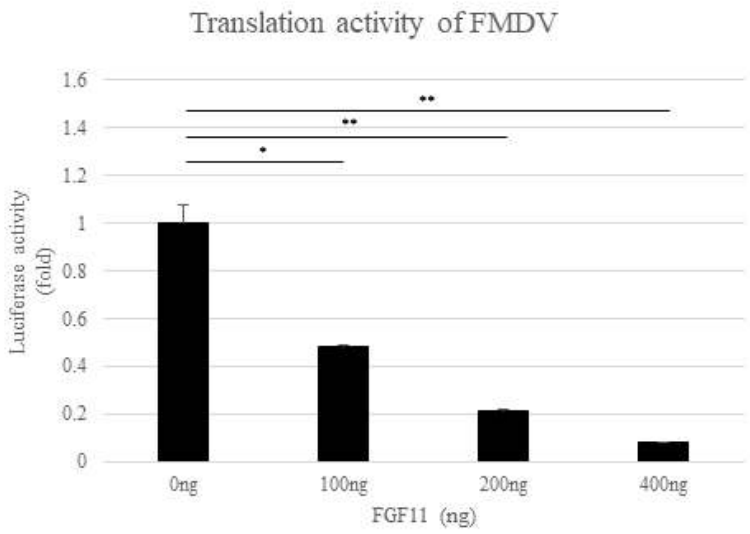


그림 108. FGF11에 의한 FMDV 유전자 발현 효율 감소

- 이 결과는 FGF11이 FMDV 유전자 발현 조절 부위에 작용하여 FMDV 바이러스 게놈 복제와 단백질 생성 감소를 통하여 항바이러스 효과의 가능성을 보여줌.

- 다음으로 FGF11이 in vitro system이 아닌 숙주세포 내에서 감염된 FMDV의 복제와 방출에 대해서 항바이러스 효과를 가지는지 확인하였음. FMDV에 의해 감염된 숙주세포인 돼지 IBRS-2 세포는 24 시간 내에 세포병변효과(CPE, cytopathic effect)를 보였음. 하지만 FGF11이 발현됨에 따라 negative control과 마찬가지로 세포병변효과는 나타나지 않았음 (그림 109).

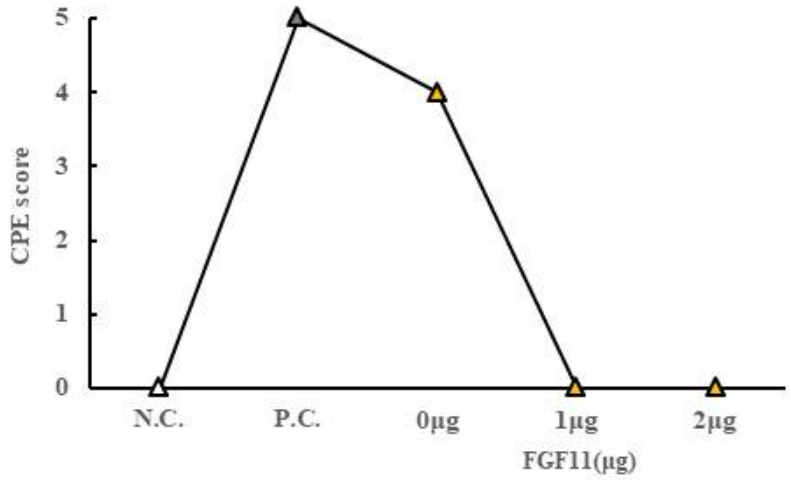


그림 109. FGF11에 의한 FMDV에 대한 CPE 효과 감소

- 세포병변효과 결과와 더불어 FGF11이 FMDV 복제에 따른 유전자 생성에 직접적으로 미치는 영향을 조사하기 위하여 real time-qPCR 분석을 실시하였음. PCR 분석 유전자 타겟으로는 FMDV의 3D (RNA polymerase) 유전자의 발현을 이용하였음. FGF11 발현이 없는 상태에서 FMDV의 세포감염은 세포변성효과가 나타난 후에 뚜렷한 3D 유전자의 복제가 확인되었음. FGF11 발현은 같은 조건에서 FMDV의 3D 유전자 복제의 결과로 copy number가 negative control 수준으로 거의 측정되지 않을 수준으로 확인되었음 (그림 110). 이 결과들은 FGF11이 실제로 구제역바이러스에 감염된 세포에서 항바이러스 효과를 가짐을 보여줌.

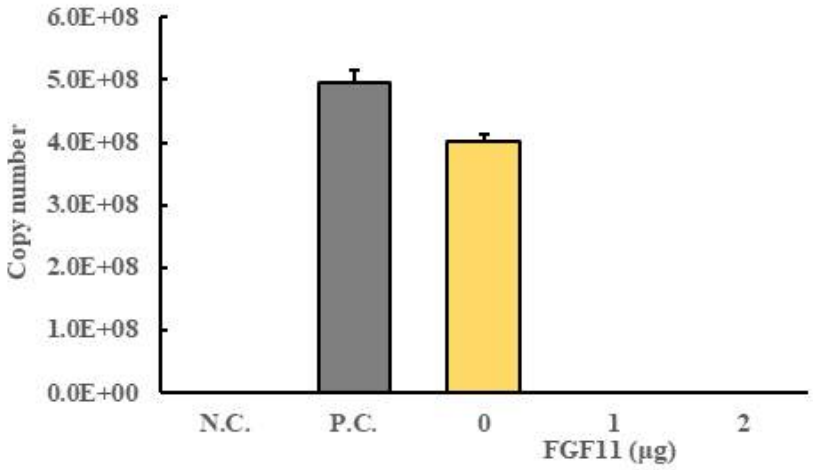


그림 110. FGF11에 의한 FMDV의 copy number 감소

② ribavirin

- 구제역바이러스와 같은 Picornavirus에 속하는 바이러스들에게서 개발된 전파력 제어 단계 중 하나인 바이러스 RNA 전체 게놈의 복제를 억제하는 물질들을 정리하였음 (그림 111)

Stage	Inhibitor	Virus
② RNA replication	Ribavirin	여러 RNA virus
	Guanidine Hydrochloride	several coxsackieviruses, echoviruses, FMDV, but not the hepatitis A virus
	HBB	coxsackievirus B strains, some echoviruses and some coxsackievirus A strains (not rhinovirus, FMDV, HAV)
	MRL-1237	Poliovirus, some coxsackievirus B types
	TBZE-029	coxsackievirus B3
	Enviroxime and analogues	Rhinovirus, enteroviruses
	2-FMC	HRV-2
	Isothiazole Derivatives	poliovirus type 1
	Flavonoids	broad range of picornaviruses
	Gliotoxin	Poliovirus
	Nucleoside analogues	FMDV
	PDTC	poliovirus, coxsackievirusB3, mengovirus en humanrhinoviruses

그림 111. 다른 Picornavirus의 RNA 게놈 복제를 저해하는 억제물질

- 이들 억제 후보 물질들 중에서 ribavirin을 효과를 조사하였음. 그림 110에서 ribavirin은 FMDV 5'UTR reporter의 활성을 100 uM의 적은 농도에서도 50% 이상 감소시키는 것을 알 수 있었음. 농림축산검역본부 BL3 시설에서 수행된 구제역바이러스 세포 감염 실험에서도 ribavirin은 구제역바이러스의 copy number를 감소시켰음

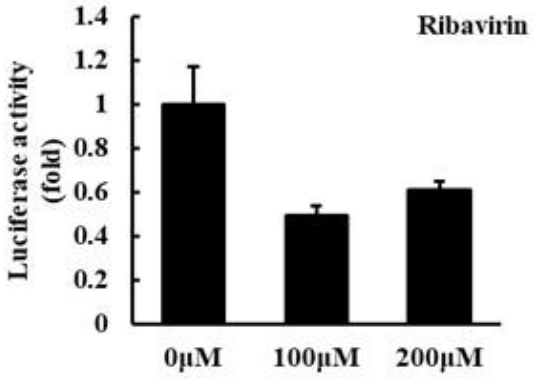


그림 112. FMDV 5'UTR-luciferase 레포터 발현 시스템을 이용한 ribavirin의 FMDV 유전자 발현 억제 효과 분석

③ Macrolactin

- 마크로락틴(Macrolactin)은 1989년 Gustafson에 의하여 미분류된 해양미생물에서 세계최초로 분리되어 발표되었음. Macrolactin A~F까지 총 6종류의 Macrolactin류를 분리규명하였고, 추가로 Macrolactinic acid와 isomacrolactinic acid를 분리하여 보고하는 등 Macrolactin 류로 20여종을 보고하였음. 이들 macrolactin류는 현재까지 Anti-corna-19, Anti-HIV, anti-iridovirus, Anti-simplex virus 작용. Anti-rotavirus 등이 알려져 있음.

- 바실러스 벨레젠시스(Bacillus velezensis), 바실러스 폴리퍼멘티쿠스(Bacillus Polyfermenticus) 및 바실러스 아밀로리퀴페시언스 (Bacillus amyloliquefacience)로 이루어진 군으로부터 선택되는 유효성분으로 포함하는 구제역바이러스 감염과 전파 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개발하고자 하였음. 마크로락틴 유도체는 하기 군으로 이루어진 화합물임 (그림 113)

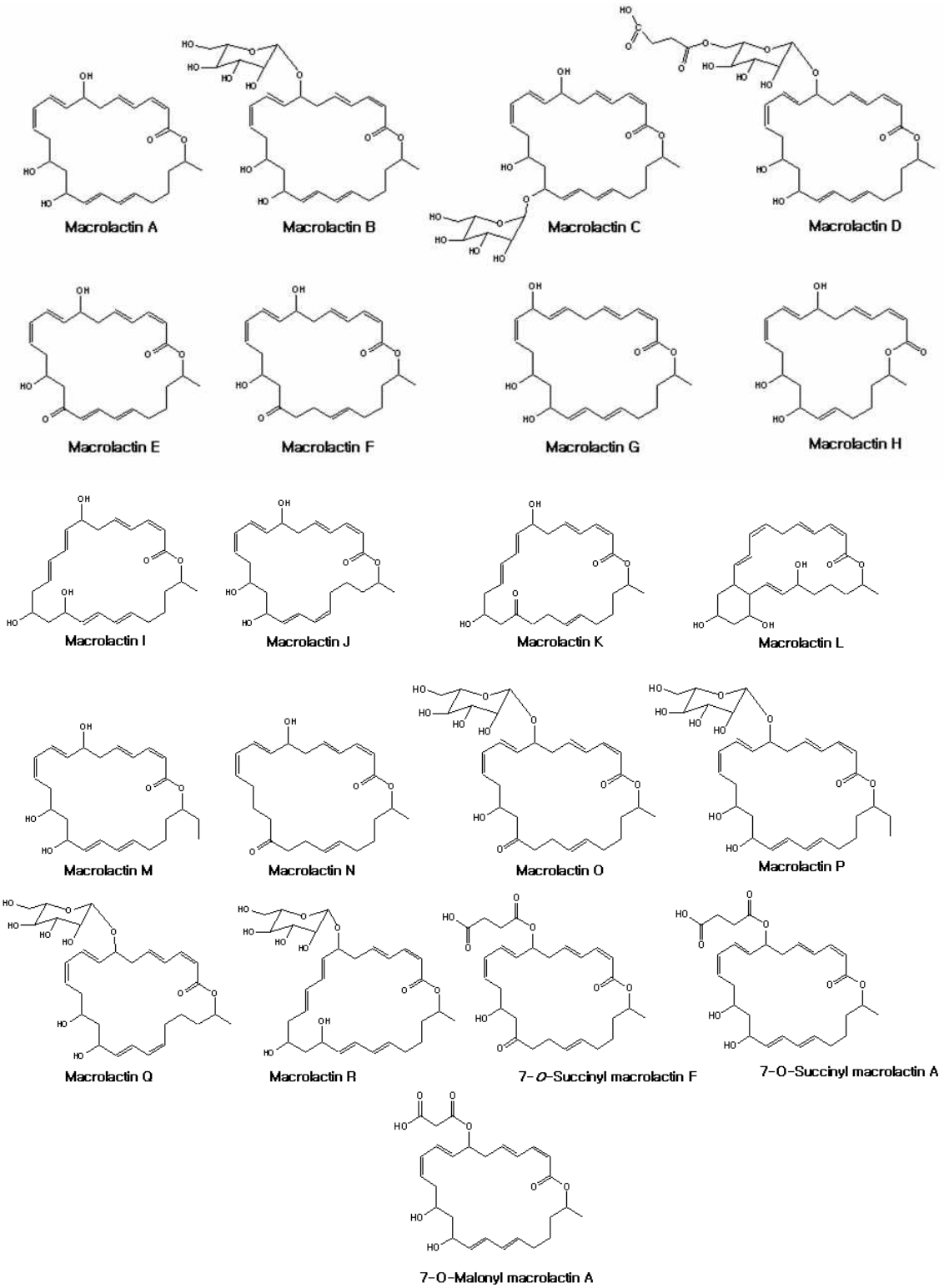


그림 113. 구제역바이러스 전파억제물질로 사용한 바실러스균에서 유래한 마크로락틴 유도체들

- Bacillus velezensis KJS-4를 배양하였고 7 liter 자동발효기를 이용하여 배양하였음. 자동발효기를 사용하기 전에는 보관된 종균을 멸균된 TSB(tryptic soy brith)에 무균적으로 접종하여 37 ℃에서 200 rpm 교반속도로 배양하였음. 600 nm에서 흡광도가 0.7 까지 도달할때까지 배양하였고, 이 용액 0.5 리터를 자동발효기의 7 리터 발효액에 분주하였음. 이용한 발효액은 MA medium -1을 이용하였음.

- 1일에 2회씩 발효액을 무균적으로 소량 분취하여 실험에 사용하였음. 원심분리하여 상등액을 취하고 동일한 부피의 Ethyl-acetate (E.A.)을 넣었음. 잘 혼합하여 추출하고 그중에서 50% 내외의 E.A.를 수거하여 감압농축하였음. 농축물을 메탄올에 녹이고 LC/Mass를 이용하여 분석하였음. 분석기기는 Agilent 1100 high-pressure liquid chromatography 였으며, 검출기는 an online diode array detector (DAD) 였음. 분석조건은 양성 또는 음성 모드에서 electrospray ionization 장치를 가진 an Agilent mass selective detector (MSD)를 이용하였음. 분석파장은 UV 262 nm 였고, 이동상은0.1% formic acid를 함유하는 acetonitrile (ACN)과 정제수를 이용하였음. ACN의 농도는 20분동안 0%에서 100% 까지 일정하게 농도를 높여서 사용하였음. 고속액체크래마토그래미(HPLC) 분석을 위하여는 “Shimadzu Class vp"기종을 사용하여 분석하였다. 분석결과로 2.5일에 상당량의 주요성분이 검출되었음

- 4개의 chromatogram에서 각각의 피크의 분자량을 체크하였고, 각각의 Peak의 특징은 아래 그림 114와 같다. 분자량에 따른 추정 macrolactin은 “The predicted compound"에 표기하였음

Compounds	No of fractions	λ_{max}	Mass to charge ratio observed in positive ion mode	The predicted compounds
		nm	m/z	
I	2nd, 3rd	230, 262	426.0, 442.0	Macrolactin A, F, G, I, J, K, L
II	2nd	230, 258	511.7	7-*O*-malonyl macrolactin A
III	3rd	230, 264	424.0	Macrolactin E
IV	3rd	236, 260	426.0, 442.0	Macrolactin A, F, G, I, J, K, L
V	2nd, 3rd	230, 258	525.8	7-*O*-succinyl macrolactin A or F

그림 114. chromatography에 분리한 macrolactin 함유 추출물

- Macrolactin A의 급성독성시험을 위해서 급성독성 Guideline(정부지침)에 따라서 수행하였음. 투여 후 14이간 관찰하였고, 경구와 복강으로 투여하는 두경로를 선택하였음. 각각 4마리를 하나의 군으로 하여 실험하였음. 경구투여는 500, 1000, 2000 ㎎/㎏ mouse b.w. 으로 투여하였으며, 복강으로는 2000 ㎎/㎏ mouse b.w.으로 투여하였음. 사망이나 특별한 증상을 보이는 것은 없었다. 몸무게의 변화도 없었으며, 행동에 대한 특이한 점은 관찰되지 않았음.

- IBRS-2에 대하여 SMA(7-O-Succinyl macrolactin A)를 농도별로 처리하여 세포의 생존력을 관찰하였음. SMA처리농도를 2^{1}, 2^{0}, 2^{-1},2^{-2},2^{-3},2^{-4},2^{-5}, 2^{-6} mg/ml로 처리했을 경우에 SMA를 2^{-4} mg/ml로 이하로 처리했을 경우에 처리 후 2시간과 3시간 모두에서 세포 생존력에 큰 영향이 없었음 (그림 115).

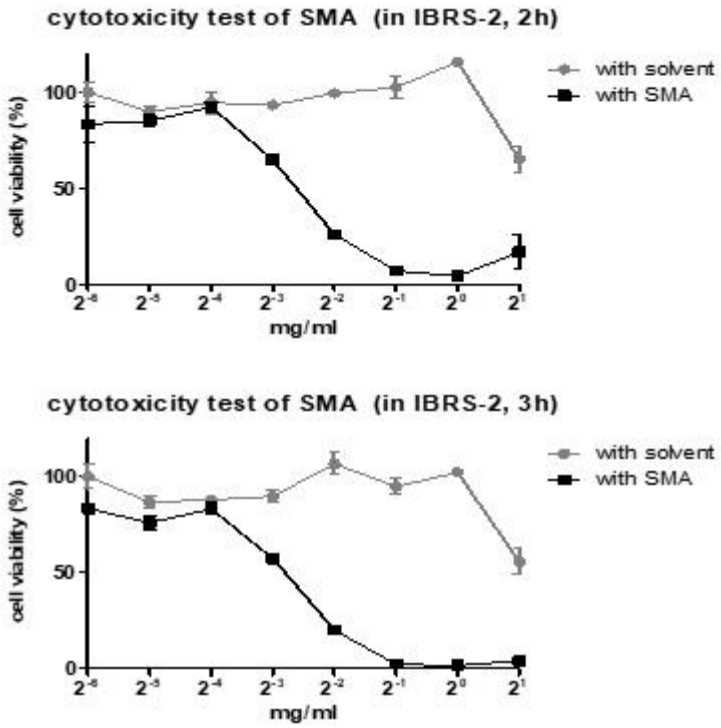


그림 115. 돼지 세포 IBRS-2를 이용한 7-O-숙시닐 마크로락틴 A의 세포독성시험

- SMA를 2^{-4} mg/ml로 이하로 처리했을 경우에 처리 후 2시간과 3시간 모두에서 세포 생존력에 큰 영향이 없었음. SMA를 다양한 농도로 돼지세포인 IBRS-2 세포에 처리한 결과 FMDV 5'UTR의 유전자 발현 활성을 현저히 감소시켰음 (그림 116).

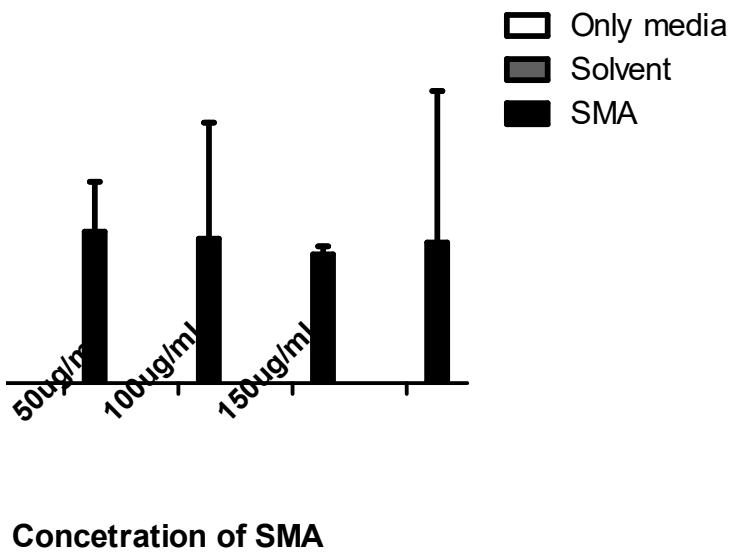


그림 116. FMDV 5'UTR 레포터 시스템을 이용한 7-O-숙시닐 마크로락틴 A의 항바이러스 효과

- 세포병변효과 결과와 더불어 SMA의 FMDV 복제에 따른 유전자 생성에 직접적으로 미치는 영향을 조사하기 위하여 real time-qPCR 분석을 실시하였음. PCR 분석 유전자 타겟으로는 FMDV의 3D (RNA polymerase) 유전자의 발현을 이용하였음. SMA 처리가 없는 상태에서 FMDV의 세포감염은 세포변성효과가 나타난 후에 뚜렷한 3D 유전자의 복제가 확인되었음. SMA의 세포처리는 같은 조건에서 FMDV의 3D 유전자 복제의 결과로 copy number가 SMA 농도 의존적으로 70% 이상 감소시킴이 확인되었음 (그림 117). 이 결과들은 SMA가 구제역바이러스에 감염된 세포에서 항바이러스 효과를 가짐을 보여줌.

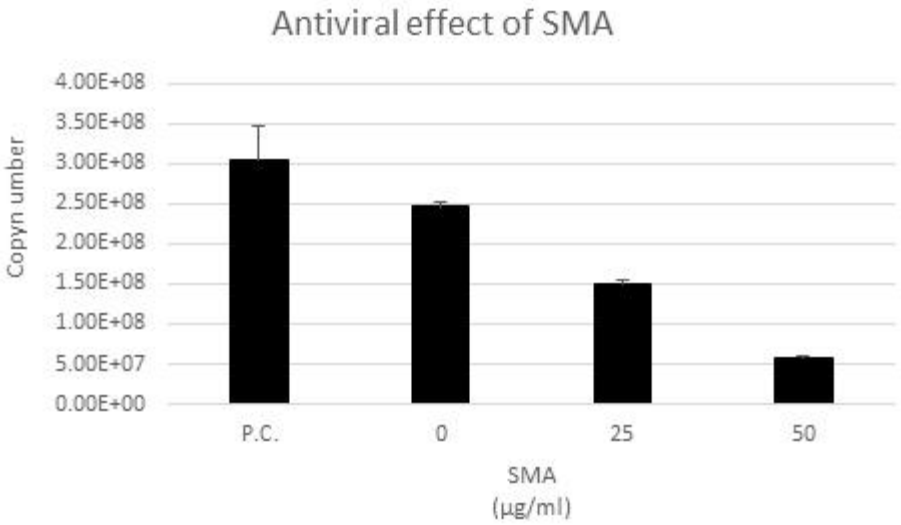


그림 117. 돼지세포의 FMDV 감염 실험에서 7-O-숙시닐 마크로락틴 A의 항바이러스효과

- 구제역바이러스와 같은 Picornavirus에 속하는 바이러스들에게서 개발된 전파력 제어 단계 중 하나인 바이러스 단백질 합성을 억제하는 물질들을 정리하였음 (그림 118).

Stage	Inhibitor	Virus
③ Protein translation	Peptide aldehydes	HRV
	Michael acceptor-containing	HRV-14
	AG7088/Rupintrivir	a broad spectrum of picornaviruses
	Azapeptides	HAV
	Diazomethyl Ketones	HRV-14
	Peptidyl monofluoromethylketones	HAV
	keto-Glutamine analogues	HAV
	S-nitrosothiols	HRV
	peptidyl N-iodoacetamides	HAV, HRV, and poliovirus
	Tripeptidyl α-ketoamides	HRV-14 and HRV-16
	2-pyridine-countaining peptidomimetics	HRV
	substituted benzamide inhibitors	
	Isatins	HRV
	spiro-indolinone β-lactams	HRV
	Homophthalimides	rhinovirus
	β-Lactones	HAV
	Pseudoxazolones	HAV
	Thio alkylating agents	HRV
	classic elastase-specific inhibitors	poliovirus and HRV-14
	Homophthalimides	HRV-14
	peptide-based fluoromethyl ketones	HRV

그림 118. 다른 picornavirus들에서 단백질 생성 단계에서 저해하는 후보물질들

- 단백질 생성을 저해하는 후보물질들로서 ketone 유도체들과 lactone 계열 화합물 등이 포함되어있음. macrolactin A는 이에 속하는 물질임. 컴퓨터 시뮬레이션에 의해 macrolactin A는 구제역바이러스의 3C protease와 3D polymerase에 결합할 가능성이 있음 (그림 119). 특히 macrolactin A는 3C protease에 강하게 결합하는 결과를 얻을 수 있어서 3C protease에 의한 비구조단백질들의 processing을 억제하여 구제역바이러스의 복제와 전파를 저해하는 가능성을 제공함

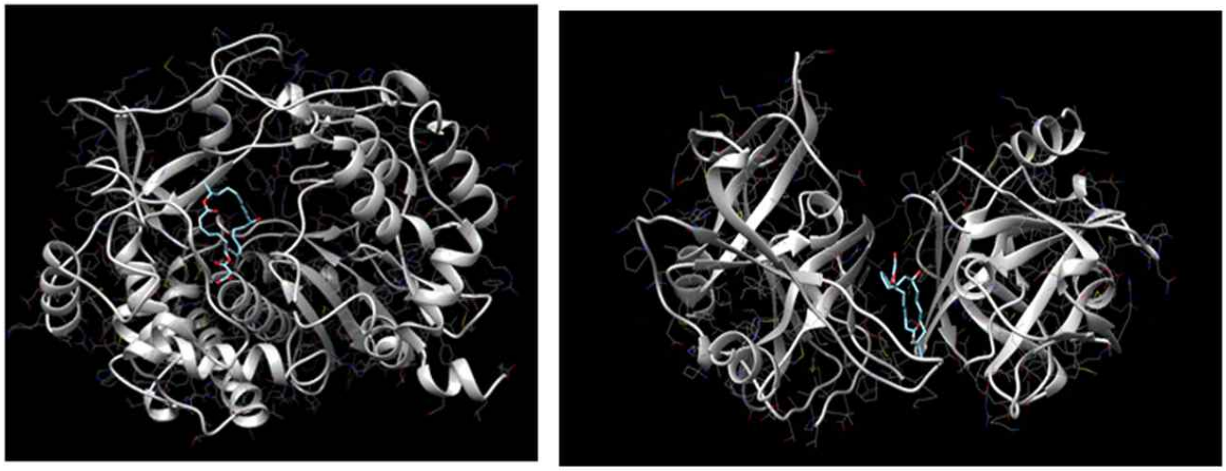


그림 119. macrolactin A의 3D polymerase 가상 결합(왼쪽)과 3C protease와의 가상 결합 (오른쪽)
프로그램명: AutoDock Vina, MGLTools, Pymol

- 구제역바이러스의 전파력 결정인자를 바탕으로 하는 활용방안 연구

① 구제역바이러스의 전파력 결정인자들의 유전자 변이의 분자 역학 내용을 분석하여 역학 정책 수립에 활용할 수 있는 방안을 개발함

- 구제역바이러스 5'UTR 내에 있는 CRE RNA의 유전자 변이 내용을 이용하여 구제역바이러스 전파력과 감염능력이 다른 소와 돼지의 종특이성 감염 바이러스의 조기 진단 시스템을 구축할 수 있음. 이를 활용하여 초기 구제역바이러스 방역 대책 수립에 정보를 제공할 수 있음

- 구제역바이러스의 3D polymerase의 S288R, 2C 단백질의 L287Q, CRE C42T 유전자 변이는 구제역바이러스의 copy number를 증가시킬 수 있음 (그림 120). 신규 구제역바이러스의 동일 유전자 변이가 발생할 시 전파력이 강화된 구제역바이러스 출현을 예상하고 방역 대책에 활용할 수 있음

② reverse-genetics 방법을 기반으로 전파력 결정인자들의 분석 결과를 활용하여 DIVA(백신접종 숙주동물 로부터 바이러스 감염동물을 구별) 백신의 개발에 착수할 수 있는 방안을 개발함

- 구제역바이러스 백신 바이러스주를 돼지에 주입하였을 때 돼지 생체 내에서 바이러스 copy number가 지속적으로 높게 유지가 되면 백신에 의한 면역능이 증가할 수 있을 것으로 기대됨. 본 연구에서 이용된 변이 바이러스주들 중에서 가장 높은 copy number를 생성하는 바이러스주의 유전자 서열을 DIVA 백신 개발에 활용할 수 있을 것임

Mutant	$TCID_{50}$/0.1ml
1 Cre T14G	$2.00*10^6$
2 Cre C42T	$5.00*10^6$
3 2C C248I	$2.50*10^6$
4 2C L287Q	$5.00*10^6$
5 3A T145P	$2.50*10^6$
6 3D A33E	$4.00*10^6$
7 3D S288R	$10.00*10^6$

그림 120. 7개 제작된 구제역바이러스 변이주의 돼지 숙주세포 감염에 의한 바이러스 copy number 산출 분석

- 구제역바이러스의 3D polymerase의 S288R, 2C 단백질의 L287Q, CRE C42T 유전자 변이를 함유한 바이러스를 백신 플랫폼으로 활용한다면 백신 능력이 약한 돼지에서 백신주로 활용할 수 있음

③ 바이러스와 숙주종별 전파력 결정인자들의 유전자 변이 분석을 통한 바이러스 숙주 종특이성 판별을 위한 분자마커의 활용 개발

- 소와 돼지 숙주세포의 구제역바이러스 복제와 전파 관련 인자들의 차별화된 특성으로 인하여 구제역바이러스 감염과 복제의 차이가 생성될 수 있는 가능성을 제공함 (그림 121). 본 연구에서 구제역바이러스의 전체 유전자 발현과 복제를 조절하는 5'UTR 지역의 CRE RNA의 유전자 변이에 따른 소와 돼지의 숙주 종특이성 판별을 위한 유전자 분자마커를 개발하였음

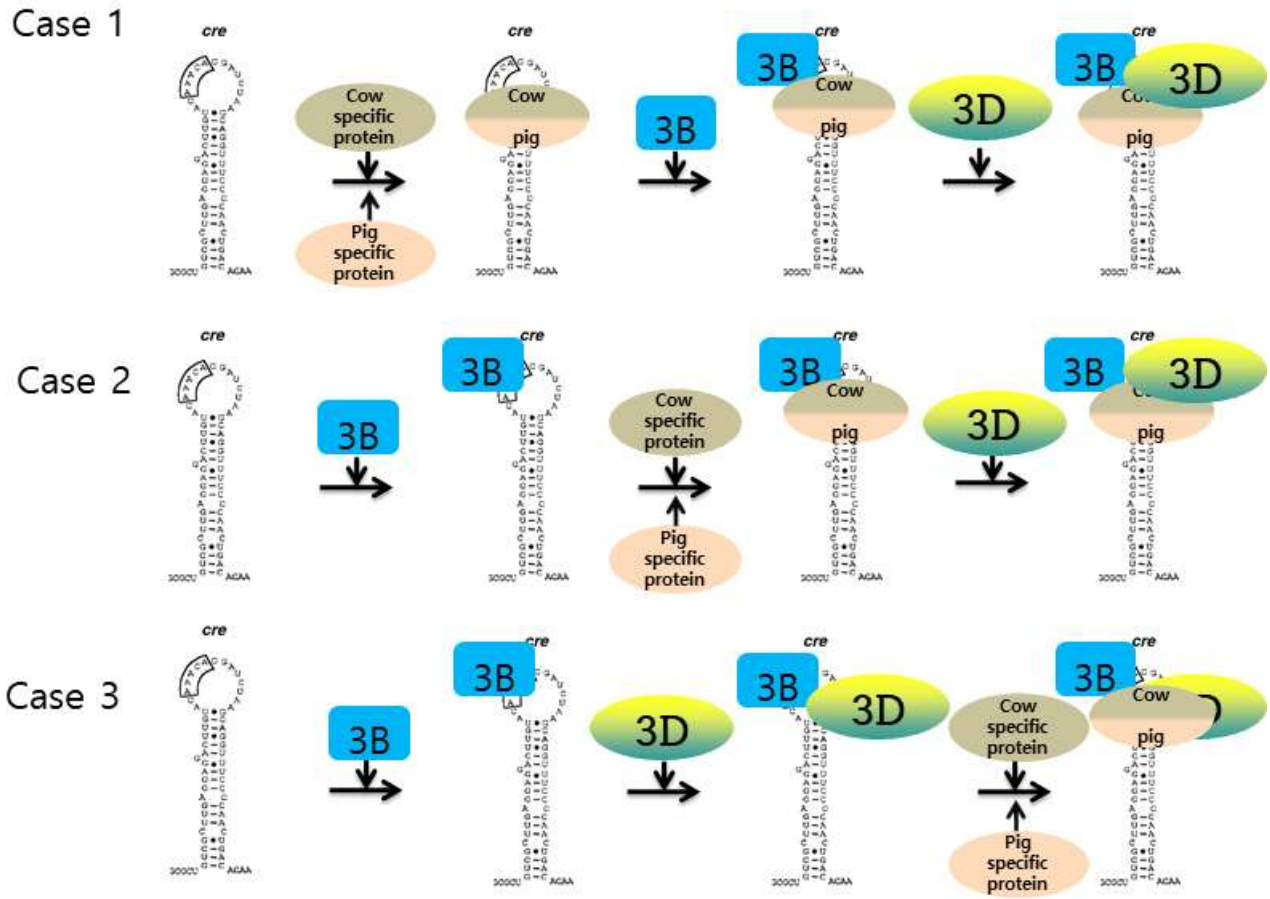
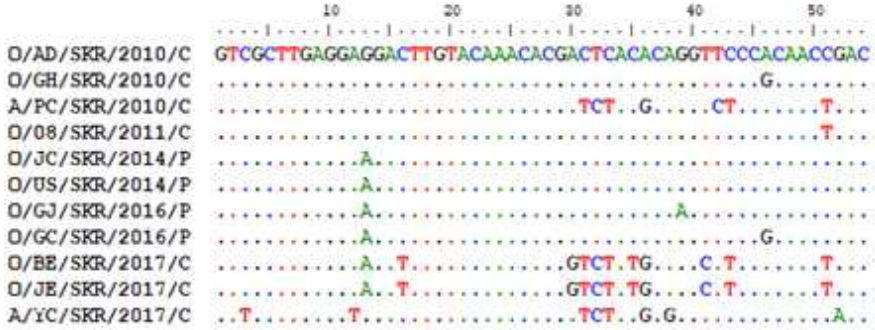


그림 121. 구제역바이러스 CRE RNA의 변이 특성에 따라서 소와 돼지 숙주세포의 다른 전파력 결정 인자들의 차별적인 상호작용 모델

- 국내 감염 발생에서 획득한 구제역바이러스를 소와 돼지 감염으로 구분하여 CRE RNA 변이 서열 분석을 수행하였음 (그림 122). CRE RNA 서열 만으로는 뚜렷한 소와 돼지의 판별 특징은 찾기 어려웠지만, CRE RNA의 2차 구조를 분석하면 소와 돼지 감염 구제역바이러스 CRE RNA의 구조 차이를 발견할 수 있었음

A



B

3	C		31-33	CTC		41	T	
	T	A/YC/SKR/2017/C		TCT	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/YC/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C		C	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C
12	A					42	T	
	T	A/YC/SKR/2017/C					C	A/PC/SKR/2010/C
13	G		35	C		43	C	
	A	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C O/GJ/SKR/2016/P O/GC/SKR/2016/P O/US/SKR/2014/P O/JC/SKR/2014/P		T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C		T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C
16	C		36	A		46	A	
	T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C		G	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/YC/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C		G	O/GC/SKR/2016/P O/GH/SKR/2010/C
30	A		38	A		51	C	
	G	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C		G	A/YC/SKR/2017/C		T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C O/SKR/08/2011/C A/PC/SKR/2010/C
			39	G		52	G	
				A	O/GJ/SKR/2016/P		A	A/YC/SKR/2017/C

그림 122. 국내 발생 FMDV 바이러스 유전자 CRE 부위의 변이 서열을 이용한 숙주 감염 종특이성 판별 마커 개발 분석

- 소 감염 구제역바이러스의 CRE RNA 2차 구조와는 달리 돼지 감염 구제역바이러스의 CRE RNA 2차 구조에는 circle 아래에 5각형 대신 7각형의 특이 구조가 형성되어 있음 (그림 122). 다른 RNA 2차 구조는 구제역바이러스와 숙주세포의 복제 조절 단백질들의 결합 효율성이 달라질 수 있음

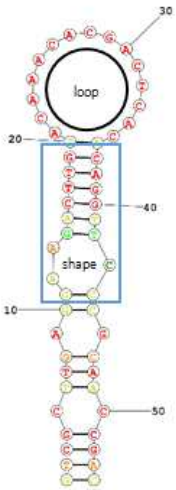
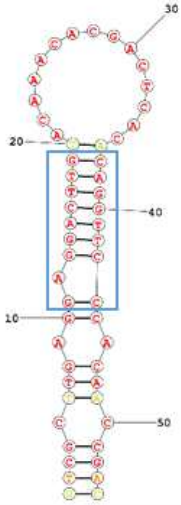
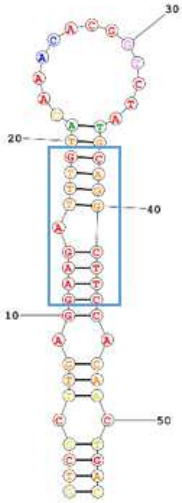
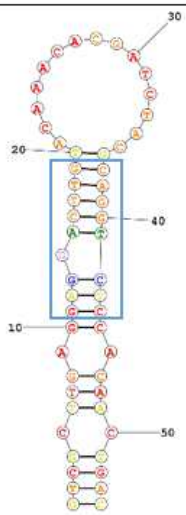
	O/GC/SKR/2016/Pig O/US/SKR/2014/Pig O/JC/SKR/2014/Pig O/GJ/SKR/2016/Pig	O/AD/SKR/2010/Cow O/AD/SKR/2010/Cow O/GH/SKR/2010/Cow A/YC/SKR/2017/Cow	O/BE/SKR/2017/Cow O/JE/SKR/2017/Cow (ProbKnot)	A/PC/SKR/2010/Cow
				
loop length	17	17	15	17
stem (1) length	7	8	6	6
stem (2) length	2	2	5	4
shape	heptagon	pentagon	pentagon	pentagon

그림 123. 국내 발생 FMDV 바이러스 유전자 CRE 부위의 변이 서열에 따른 RNA 2차구조의 차이를 숙주 감염 종특이성 판별 마커로 활용

- 구제역바이러스 CRE RNA 유전자 변이 내용을 분자 마커로 활용한 감염 종특이성 판별 시스템으로 국내 특허등록과 중국 특허출원이 되었음 (그림 124).

출 원 번 호 10-2019-0133382
발 명 의 명 칭 구제역바이러스 유전자의 특정 변이 부위를 이용한 구제역바이러스 감염숙주 종판별용 바이오마커 조성물
청 구 항 수 6

- 1 -

이 출원에 대하여 특허법 제66조에 따라 특허결정합니다.
(특허권은 특허료를 납부하여 특허법 제87조에 따라 설정등록을 받음으로써 발생하게 됩니다.) 끝.

BY201M2210FBPC-CN

国 家 知 识 产 权 局

100036
北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层西侧 605 室
北京晶源专利代理有限公司 吕琳(010-63377188),田英爱
(010-63377266)

发文日：
2020 年 10 月 26 日

申请号或专利号：202011152831.2　　发文序号：2020102601388880

专 利 申 请 受 理 通 知 书

根据专利法第 28 条及其实施细则第 38 条、第 39 条的规定，申请人提出的专利申请已由国家知识产权局受理。现将确定的申请号、申请日、申请人和发明创造名称通知如下：

申请号：202011152831.2
申请日：2020 年 10 月 26 日
申请人：釜山大学校产学协力团
发明创造名称：用于鉴别口蹄疫病毒感染宿主种类的生物标志物组合物

그림 124. FMDV CRE RNA 변이서열을 이용한 숙주 감염 종특이성 판별 시스템 개발의 국내특허등록 및 중국특허출원

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 구제역 바이러스의 숙주별 감염 전파력(특성) 결정 인자 발굴 및 이를 바탕으로 하는 구제역 바이러스 전파 억제기술 개발 연구

- 바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴
    ① CRE
    ② VP1
    ③ 2C
    ④ 3C
    ⑤ 3D
- 숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴
    ① CSD protein
    ② integrin alpha5/beta6
    ③ SREBP1
    ④ FXRalpha
    ⑤ FGF11
    ⑥ SFPQ
    ⑦ ER stress regulator

- 전파력 인자들의 숙주별 특성 차이 비교 (20건 이상)
    ① FMDV CRE 숙주별 특화 변이 발굴 (5건 이상)
    ② 숙주별(돼지, 소) integrin 유전자 변이 특성 발굴 (2건 이상)
    ③ FMDV 2C 단백질 숙주별 유전자 차이 발굴 (3건 이상)
    ④ VP1 결합단백질로서 occludin 단백질의 숙주별 아미노산 차이 발굴 (3건 이상)
    ⑤ FMDV 3C 숙주별 변이체 단백질의 protease로서의 기능 차이 발굴 (3건 이상)
    ⑥ FMDV 3D polymerase의 숙주별 FMDV 전사활성 차이 발굴 (4건 이상)

- 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 10건 이상 확보

Region	NA	AA	R-Shamir 기준
Cre	T14G		T614G
	C42T		C642T
2C	C743T	T248I	C5151T
	TTG(859-861)CCA/CAG	L287Q	TTG(5267-5269)CCA/CAG
	A713G	E238G	
	GTA(846-849)ATG	V283M	
3A	ACC(433-435)CCC/CCT	T145P	ACC(5795-5797)CCC/CCT
3D	GCA(97-99)GAG/GAC/GAA	A33E/D	GCA(6770-6772)GAG/GAC/GAA
	AGC(865-867)CGC	S288R	
	AGC(139-141)AAC	S47N	AGC(7538-7540)CGC
	TCC(691-693)GCC	S231A	

- 전파력 인자 바이러스 변이주들 3종 이상의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 연구
  ① Wild type Shamir 및 Shamir mutants 3종- Cre, 2C, 3D 부위
  ② 실험동물 : 구제역 항원/항체 음성 SPF 미니돼지 20두
  병원성 실험용 약 8~12주령 그룹당 5마리씩 총 20두

- 구제역바이러스 전파력 결정 인자를 표적으로 하는 억제 물질 3건 이상 발굴
  ① FGF11
  ② SMA
  ③ z-gugglesterone

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명 \ 연도			1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표[1]		목표(단계별)				
		실적(누적)				
		목표(단계별)				
		실적(누적)				
연구개발과제 특성 반영 지표[2]		목표(단계별)				
		실적(누적)				
		목표(단계별)				
		실적(누적)				
계						

* 1」전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2」연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능[1])		단위	전체 항목에서 차지하는 비중[2] (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
				보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1									
2									

* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Cis-acting Replication Element Variation of the Foot-and-mouth Disease Virus is Associated with the Determination of Host Susceptibility	Journal of Life Science	정재훈	30	대한민국	Korean Society of Life Science	비SCIE	2020-11	1225-9918	75%
2	Fibroblast growth factor 11 inhibits foot-and-mouth disease virus gene expression and replication *in vitro*	Journal of Veterinary Medical Science	정재훈	Vol. 84, No. 5	일본	Japanese Society of Veterinary Science	SCI	2022-04	1347-7439	70%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국생명과학회	정재훈, 강효린, 박다애, 성미소, 장은아, 구복경	2020-08-06	경주 더 K호텔	대한민국
2	한국생명과학회	정재훈, 강효린, 박다애, 성미소, 장은아, 구복경	2020-08-06	경주 더 K호텔	대한민국
3	한국분자세포생물학회	정재훈, 강효린, 박다애, 성미소, 장은아, 장정아	2020-10-05	제주(후에 온라인개최로 변경)	대한민국
4	한국생명과학회	강효린, 장정아, 정재훈	2021-08-12	동의대학교	대한민국
5	한국생명과학회	강효린, 성미소, 장은아, 정재훈	2021-08-12	동의대학교	대한민국
6	Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance(GFRA)	장은아, 강효린, 성미소, 장정아, 정재훈	2021-11-01	부에노스아이레스 (온라인으로 참여)	아르헨티나

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허출원	중국	부산대학교 산학협력단, 농림축산 검역본부	2020-10-26	202011152831					50%	
2	특허등록	대한민국					부산대학교 산학협력단, 농림축산 검역본부	2021-04-22	10-2245638	50%	
3	특허출원	대한민국	부산대학교 산학협력단, 경성대학교 산학협력단, 주식회사 에이아이 인사이트	2021-05-24	10-2021-0066415					10%	
4	특허출원	대한민국	부산대학교 산학협력단, 한국해양 과학기술원	2021-09-10	10-2021-0120862					70%	

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1」]	인증여부[2」]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3」]	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1」]	표준명	표준기구명[2」]	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3」]	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1」]	사업화 형태[2」]	지역[3」]	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」기술이전 또는 자기실시
* 2」신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설・장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설・장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설・장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록・기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○	○	○
○	○	○

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

1. 구제역바이러스 전파력 인자 발굴, 바이러스 변이주 제작 건수, 바이러스 동물 접종 실험, 항바이러스 물질 발굴 건수 등은 모두 충족하였음
2. 지식재산권(특허등록/출원), 학회 발표와 고용 창출 등 대부분의 정량적 목표는 초과 달성하였지만, SCI 논문 출간은 목표로 한 정량치에 미달하였음. SCI 논문의 투고 시점이 특허출원 이후에 진행되어서 지체가 발생하였음
3. 연구내용의 특성상 논문의 수정의견들이 구제역바이러스의 동물 감염 실험을 요청하였음. 구제역바이러스의 동물 감염 실험은 농림축산검역본부의 BL3 시설에서 수행되어야하고 실험 동물의 입하와 IRB 심사와 BL3 시설 대기 등 논문 수정 요청 실험을 수행하는데 지체 이유가 발생하였음. 현재 목표 정량치에 해당하는 논문 작성은 완료된 상태여서 투고와 수정보완 재투고를 준비 중에 있음

2) 자체 보완활동

1. 현재 1편의 SCI논문과 1편의 비SCI 논문이 출간되었음. 투고하고 있는 논문이 1편이 있음. 내용은 FMDV CRE RNA와 상호결합하는 PCBP2 숙주단백질의 기능 조절에 관한 것임
2. 투고 준비중인 논문이 2편 있어서 최소한 올해 안으로 2편의 SCI급 논문이 출간될 예정임. 내용은 구제역바이러스 항바이러스 물질로 특허출원된 macrolactin A와 z-gugglesterone의 발굴과정과 항바이러스 기능에 관한 연구결과임
3. 농림축산검역본부의 BL3 시설에서 수행중인 연구결과들이 올해 상반기 내에 도출될 것으로 예상되므로 올해 하반기에 투고 계획하는 논문이 2편 있음. 올해 말과 내년 초 까지 2편의 논문이 추가로 출간될 수 있도록 진행할 것임

3) 연구개발 과정의 성실성

아래의 연구목표를 상회하는 정성적 연구결과를 성실하게 도출하고 학회/특허등록출원/연구논문으로 산출하였음

1. 바이러스 전파력 결정 인자 5건 이상 발굴
 ① CRE, ② VP1, ③ 2C, ④ 3C,⑤ 3D

2. 숙주별 전파력 결정 인자 7건 이상 발굴
 ① CSD protein, ② integrin alpha5/beta6, ③ PCBP2, ④ FXRalpha, ⑤ FGF11, ⑥ SFPQ, ⑦ ER stress regulator

3. 전파력 인자들의 숙주별 특성 차이 비교 (20건 이상)
 ① FMDV CRE 숙주별 특화 변이 발굴 (5건 이상)
 ② 숙주별(돼지, 소) integrin 유전자 변이 특성 발굴 (2건 이상)
 ③ FMDV 2C 단백질 숙주별 유전자 차이 발굴 (3건 이상)
 ④ VP1 결합단백질로서 occludin 단백질의 숙주별 아미노산 차이 발굴 (3건 이상)
 ⑤ FMDV 3C 숙주별 변이체 단백질의 protease로서의 기능 차이 발굴 (3건 이상)
 ⑥ FMDV 3D polymerase의 숙주별 FMDV 전사활성 차이 발굴 (4건 이상)

4. 전파력 인자 변이체 함유 구제역바이러스 변이주 10건 이상 확보

5. 전파력 인자 바이러스 변이주들 3종 이상의 돼지 감염에 의한 전파력과 병원성 연구

6. 구제역바이러스 전파력 결정 인자를 표적으로 하는 억제 물질 4건 이상 발굴
 ① FGF11, ② macrolactin A, ③ z-gugglesterone, ④ ribavirin

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 구제역바이러스의 전파력 결정인자들의 유전자 변이의 분자 역학 내용을 분석하여 역학 정책 수립에 활용할 수 있는 방안을 개발함

- 구제역바이러스 5'UTR 내에 있는 CRE RNA의 유전자 변이 내용을 이용하여 구제역바이러스 전파력과 감염능력이 다른 소와 돼지의 종특이성 감염 바이러스의 조기 진단 시스템을 구축할 수 있음. 이를 활용하여 초기 구제역바이러스 방역 대책 수립에 정보를 제공할 수 있음

- 구제역바이러스의 3D polymerase의 S288R, 2C 단백질의 L287Q, CRE C42T 유전자 변이는 구제역바이러스의 copy number를 증가시킬 수 있음. 신규 구제역바이러스의 동일 유전자 변이가 발생할 시 전파력이 강화된 구제역바이러스 출현을 예상하고 방역 대책에 활용할 수 있음

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

① reverse-genetics 방법을 기반으로 전파력 결정인자들의 분석 결과를 활용하여 DIVA(백신접종 숙주동물 로부터 바이러스 감염동물을 구별) 백신의 개발에 착수할 수 있는 방안을 개발함

- 구제역바이러스 백신 바이러스주를 돼지에 주입하였을 때 돼지 생체 내에서 바이러스 copy number가 지속적으로 높게 유지가 되면 백신에 의한 면역능이 증가할 수 있을 것으로 기대됨. 본 연구에서 이용된 변이 바이러스주들 중에서 가장 높은 copy number를 생성하는 바이러스주의 유전자 서열을 DIVA 백신 개발에 활용할 수 있을 것임

② 바이러스와 숙주종별 전파력 결정인자들의 유전자 변이 분석을 통한 바이러스 숙주 종특이성 판별을 위한 분자마커의 활용 개발

- 소와 돼지 숙주세포의 구제역바이러스 복제와 전파 관련 인자들의 차별화된 특성으로 인하여 구제역바이러스 감염과 복제의 차이가 생성될 수 있는 가능성을 제공함. 본 연구에서 구제역바이러스의 전체 유전자 발현과 복제를 조절하는 5'UTR 지역의 CRE RNA의 유전자 변이에 따른 소와 돼지의 숙주 종특이성 판별을 위한 유전자 분자마커로 활용할 계획임

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		5
	비SCIE		
	계		5
국내논문	SCIE		
	비SCIE		2
	계		2
특허출원	국내		3
	국외		2
	계		5
특허등록	국내		2
	국외		1
	계		3
인력양성	학사		
	석사		4
	박사		2
	계		6
사업화	상품출시		
	기술이전		1
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			1. 구제역바이러스 종특이성 판별 유전자 진단 시스템 개발 1. 구제역바이러스 전파력 억제 물질 발굴 1. 돼지세포내 비병원성 구제역바이러스 복제를 증가시키는 바이러스 변이주 제작

7. 최종보고서의 수정, 보완 사항

1) 구제역바이러스의 특성 상 임상실험 제한으로 인한 세포내 실험 수행 결과들의 제시

① 구제역바이러스의 유전자 발현의 변화를 분석하기 위한 세포 수준에서의 in vitro reporter 시스템을 구축

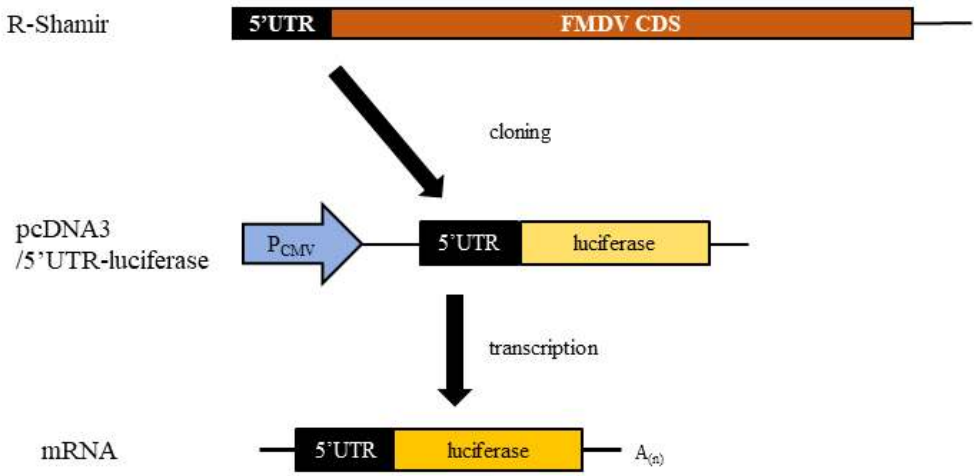


그림 7-1. FMDV 5'UTR 유전자 발현 조절을 정량적으로 분석하기 위한 recombinant reporter construct (FMDV 5'UTR-luci) 구축

② 구제역바이러스가 감염되는 돼지숙주세포주인 IBRS-2 세포에 그림 7-1의 FMDV 5'UTR repoter를 transfection하고 동시에 flag-FGF11 expression plasmid를 co-transfection 시킨 후 세포 내에서 FGF11이 발현 정도를 조사하였음. 그림 7-2에서 flag-FGF11의 transfection 도입 양에 비례하여 FGF11 단백질의 발현이 증가함을 확인하였음. FGF11의 발현이 IBRS-2 숙주세포의 cell viability에는 영향을 주지 않음을 추가로 확인하였음 (그림 7-2).

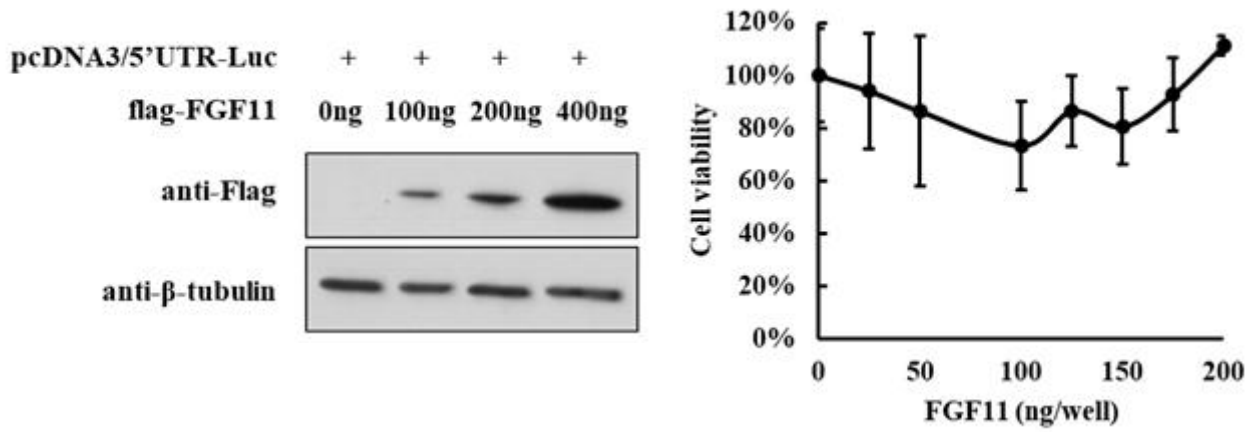


그림 7-2. FMDV 5'UTR-luciferase 레포터 발현 시스템을 이용한 FGF11의 FMDV 유전자 발현 억제 효과 분석에서 FGF11 유전자의 transfection에 의한 FGF11 단백질 발현양의 검증

③ FMDV 5'UTR-luci 시스템과 함께 FGF11 발현 플라스미드를 FMDV의 숙주세포인 돼지세포 IBRS-2 세포에 transfection(유전자 도입)한 다음, FMDV 5'UTR 발현 조절 정도를 luciferase 활성을 측정하여 비교분석하였음. FGF11의 다양한 발현양을 적용하였을 때, FGF11의 발현양 의존적으로 FMDV 유전자 발현이 감소함을 확인하였음 (그림 7-3).

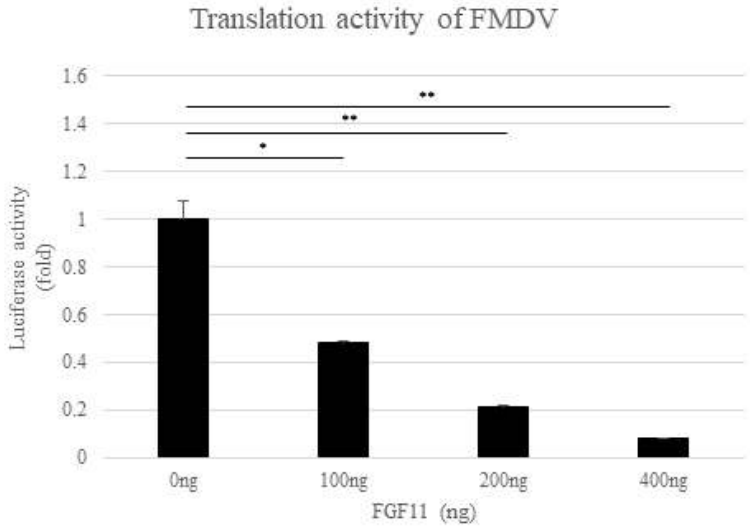


그림 7-3. FGF11에 의한 FMDV 유전자 발현 효율 감소

- 이 결과는 FGF11이 FMDV 유전자 발현 조절 부위에 작용하여 FMDV 바이러스 게놈 복제와 단백질 생성 감소를 통하여 항바이러스 효과의 가능성을 보여줌.

④ 다음으로 FGF11이 in vitro system이 아닌 숙주세포 내에서 감염된 FMDV의 복제와 방출에 대해서 항바이러스 효과를 가지는지 확인하였음. FMDV에 의해 감염된 숙주세포인 돼지 IBRS-2 세포는 24 시간 내에 세포병변효과(CPE, cytopathic effect)를 보였음. 하지만 FGF11이 발현됨에 따라 negative control과 마찬가지로 세포병변효과는 나타나지 않았음 (그림 7-4).

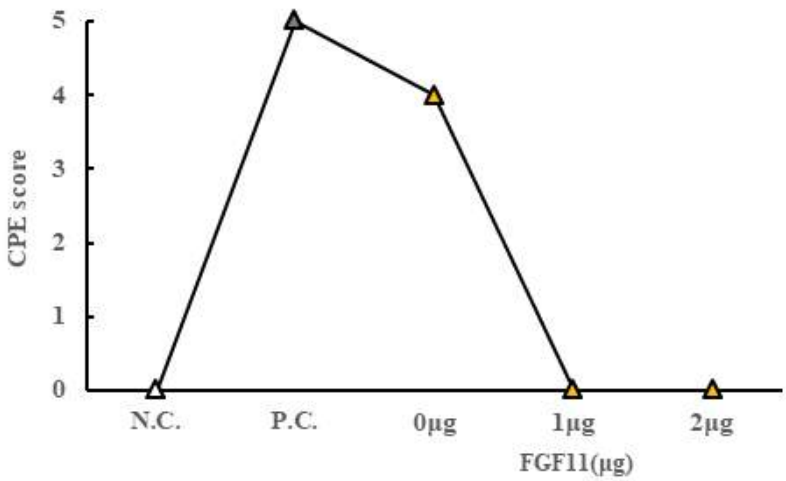


그림 7-4. FGF11에 의한 FMDV에 대한 CPE 효과 감소

⑤ 세포병변효과 결과와 더불어 FGF11이 FMDV 복제에 따른 유전자 생성에 직접적으로 미치는 영향을 조사하기 위하여 real time-qPCR 분석을 실시하였음. PCR 분석 유전자 타겟으로는 FMDV의 3D (RNA polymerase) 유전자의 발현을 이용하였음. FGF11 발현이 없는 상태에서 FMDV의 세포감염은 세포변성효과가 나타난 후에 뚜렷한 3D 유전자의 복제가 확인되었음. FGF11 발현은 같은 조건에서 FMDV의 3D 유전자 복제의 결과로 copy number가 negative control 수준으로 거의 측정되지 않을 수준으로 확인되었음 (그림 7-5). 이 결과들은 FGF11이 실제로 구제역바이러스에 감염된 세포에서 항바이러스 효과를 가짐을 보여줌.

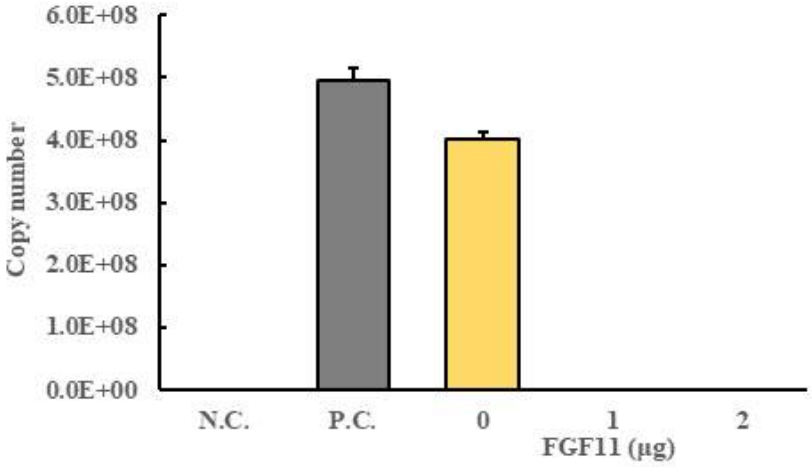


그림 7-5. FGF11에 의한 FMDV의 copy number 감소

2) FMDV의 숙주 전파력 결정인자들에 관한 연구 성과의 기존 국내외 연구결과들 요약

① [L^{pro}]

- 2가지 형태 (Lab^{pro}, Lb^{pro})가 존재. 다른 개시코돈(84 nt 차이)에 의해 단백질이 생성되며 Lb^{pro} 형태가 주 생성물임
- papain-like proteinase로 기능하며 (L^{pro})RKLK↓GAGS(VP4) 부위를 인식하여 절단함. 구제역바이러스의 활성을 가진 단백질 생성에 필수적인 기능을 수행
- 병원성의 중요인자로서 L^{pro}-결핍된 바이러스를 피하조직으로 투입하였을 시 야생형 바이러스에 비해 복제율은 약간 감소하지만, 병변을 유발하는 능력은 매우 낮아짐
- 단백질 합성인자인 eIF4G (Gly479↓Arg480) 절단에 의해 숙주세포의 단백질 합성을 저해하고 바이러스 단백질 합성에 숙주세포의 단백질 생성 기구를 우선적으로 사용하도록 함
- 인터페론(IFN) 활성을 직간접적으로 저해하며 type I IFN의 세포내 신호 활성화는 L^{pro}의 발현을 제거한 바이러스에서만 파악됨

② [2A]

- 18 아미노산 크기를 가지고 있으며 다른 picornavirus에 비해 매우 짧지만, 2A/2B 연결 영역은 잘 보존되어있음
- (2A)NPG↓P(2B)의 G가 절단 활성에 매우 중요하며 2A의 단백질 절단은 polypeptide 합성 시에만 일어남

③ [2B]

- viroporin의 기능을 가지며 저분자의 소수성 transmembrane 단백질 구조를 가짐. transmembrane 소수성 도메인은 세포막의 인지질과 결합하여 투과성을 증가시켜 바이러스 입자의 방출을 촉진함
- 154 아미노산 크기이며 2개의 transmembrane 도메인을 보유(83-104aa, 119-137aa)
- 소포체에 위치하며 2개의 transmembrane 도메인과 N-·C-말단 부분은 세포질 matrix로 확장되어있음. 구제역바이러스 유전자가 복제되는 장소가 소포체이기 때문에 복제에 직간접적인 영향을 줄 수 있음
- 숙주세포의 세포막의 견고성에 손상을 주며, Ca^{2+} 이상 조절, autophagy의 활성화를 유도
- 2BC 전구체 단백질은 소포체-골지체의 단백질 수송을 억제. 이는 숙주세포의 단백질 합성분비에 영향을 주고 구제역바이러스의 분비방출에도 기능할 수 있음을 제시
- viroporin 기능이 제거되면 적절한 바이러스의 입자의 조립과 방출이 억제됨. 이 사실은 항바이러스제 개발의 표적이 될 수 있음

④ [2C]

- 동·식물 상관없이 많은 RNA virus에 2C-like protein 존재하며 유전자 서열도 잘 보존되어있음
- 318 아미노산으로 구성되며 N-말단(17-34aa)에 amphipathic helix가 존재하여 membrane targeting 역할을 하는 것으로 추측
- 구제역바이러스 RNA 복제 복합체 형성에서 요구되는 소포체 막에 결합하는 주요 요소 작용
- 소포체 막의 견고성과 배열에 관여하여 바이러스 복제 복합체 형성에 기능을 하며 바이러스 감염에 의한 세포손상을 유도
- 구제역바이러스 복제에 중요한 인자로서 guanidin hydrochloride (2C의 길항제) 처리 시 바이러스 RNA 합성을 억제하며 guanidin-저항성 2C 변이체의 경우 저해 효과가 없음
- 바이러스 증식 동안 복제 복합체에 관여하기 때문에 백신 접종 가축과 구제역 발병 가축과 구분할 때 사용
- N-myc and STAT interacting (Nmi) 단백질과 결합하여 apoptosis를 유도하며 IFN에 의해 유도되는 35-kDa protein (IFP35)와의 결합을 통해 type I IFN 반응에 관여함이 보고됨
- Beclin1(autophagosome 형성 개시, autophasome의 리소좀 융합 기능)와의 결합을 통해 구제역바이러스에 의해 유도되는 autophagy에 관여함. 2C-induced Beclin1 불활성화를 통하여, 구제역바이러스의 autophagosome의 융합과정을 억제하여 바이러스의 분해를 막을 수 있음

⑤ [3A]

- 153 아미노산으로 구성되며 다른 picornavirus들의 3A보다 큼(poliovirus의 3A는 87aa)
- 구제역바이러스의 거의 모든 strain에서 유전자 변이가 적고 잘 보존되어있음. N-말단(1-75aa) 영역은 매우 잘 보존되어있는 반면, C-말단에는 많은 염기 돌연변이와 유전자 일부 영역의 결실이 존재

- 소포체와 골지체에 위치
- 3A·3AB 단백질 발현이 안정적으로 지속될 때 구제역바이러스 복제가 증가하지만, 3AB가 약하게 발현될 경우에는 바이러스 감염이 감소
- 병원성과 숙주 종 결정에 관여함. Q44R의 경우에 기니아피그에 잘 감염되며, 자연적인 결실 변이체들 중에서 93-102(10aa) 결실(O/TAW/97)은 돼지에게 높은 병원성을 보이고, 소에게는 전염이 되지 않음. 87-106(20aa) 결실의 경우에는 바이러스 복제 능력이 감소하고 소에게서 병원성이 감소

⑥ [3B]

- VPg라고도 불리며, 구제역바이러스 게놈의 5'-말단에 공유결합으로 결합함. 구제역바이러스를 포함한 picornavirus RNA 합성의 primer 기능을 수행
- 구제역바이러스 만의 특징으로서 비슷하지만 동일하지는 않은 3 copy (3B1, 3B2, 3B3)가 존재 (다른 picornavirus의 경우 단일 copy)
- VPg의 uridylylation은 picornavirus RNA 게놈 복제의 첫 단계이며, VPgU(pU) 형성은 peptide primer로 기능함. 잘 보존된 Tyr3 자리에 $3D^{pol}$에 의한 2개의 UMP 결합은 *cre*를 주형으로 사용
- 3 copy 모두 in vitro에서는 uridylylation이 가능 하지만, $3D^{pol}$에 대해 $3B_3$가 가장 효율적인 주형으로 작동되며 $3B_3$ 유전자의 결실 시, RNA 복제가 되지 않음 ($3B_1$, $3B_2$도 감소하기는 하지만, $3B_3$에 비해 극적이지 않음)
- $3B_3$가 가장 중요하지만, 3 copy 모두 존재할 때 최상의 RNA 복제 효율을 보임

⑦ [$3C^{pro}$]

- chymotrypsin-like cysteine protease의 기능을 가지며 대부분의 구제역바이러스 단백질들의 절단에 의한 활성 단백질들의 생성을 담당
- Q-G, E-G, Q-L, E-S 등을 절단 (poliovirus와 같은 다른 picornavirus의 $3C^{pro}$는 Q-G만 cleavage)
- eIF4A(cap-binding complex의 RNA helicase)와 eIF4G(L^{pro}보다 뒤쪽 자리를 절단) 숙주세포의 단백질 합성인자들을 절단하여 숙주세포의 정상적인 기능을 저해
- 3CD 형태로 핵 내로 이동($3D^{pol}$의 N-말단에 핵내 이동 아미노산 서열이 존재)하며 Sam68 (68 kDa Src-associated substrate during mitosis)의 C-말단의 핵내 이동 아미노산 서열을 포함하는 18kDa 부분을 잘라냄. 남은 Sam68(~50kDa)은 세포질에 위치하여 단백질 합성 조절 영역인 IRES와 결합하여 바이러스 RNA의 단백질 합성을 촉진
- 자연 면역계를 조절함. NEMO(nuclear transcription factor kappa B(NF-κB) essential modulator, bridging adaptor protein으로 NF-κB, IFN-조절인자 신호전달경로 활성화에 필수적)을 절단하여 RIG-I/MDA5 신호전달 활성화를 감소
- TATA-box binding protein, octamer-binding protein, p53, cyclic AMP-responsive element binding protein, DNA polymerse III 등을 절단하여 숙주세포의 전사와 번역을 전반적으로 교란시킴

⑧ [$3D^{pol}$]

- 구제역바이러스 유전자로부터 생성된 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)로서 바이러스 전체 게놈 유전자의 복제를 위한 positive/negative-sense RNA를 합성

- 서로 다른 serotype과 subtype에도 유전자 변이는 다른 지역 보다 적으며 잘 보존되어 있음
- 자연 상태에서 발견되는 3CD 단백질은 바이러스 복제 시 중간 기능을 수행
- 'palm', 'fingers', 'thumb'로 이루어진 'right-hand' 단백질 구조를 가짐. plam 영역에는 복제효소 활성 부위가 존재하며 모든 RNA 중합효소들에 잘 보존되어 있고, 5개의 motif로 구성(3-stranded antiparallel core β sheet 세 개, 사이에 2-α helix)되며 전체 3D 중합효소의 구조적 견고성과 뉴클레오티드 인식 결합 그리고 RNA 복제를 위한 개시 뉴클레오티드 결합의 기능을 수행함. thumb 도메인은 C-말단에 위치하며 가장 다양한 특징들을 보임
- 구제역바이러스의 경우 효소 활성 부위 공간에 VPg가 결합함 (uridylyation 반응). CVB3의 경우 thumb sub-도메인, EV71의 경우 palm 도메인의 바닥 부분에 결합
- VPg는 hydroxyl nucleophile을 제공하여 $3D^{pol}$이나 3CD와 함께 VPg uridylylation 복합체 형성
- RNA 복제 신장 시 3단계의 구조적 변화를 거침 (nucleotide 선택, phosphodiester 결합 형성, 다음 차례의 nucleotide 이동)
- 염기와 nucleotide 유사체(5-Fluorouracil, Ribavirin 등)가 항바이러스제로 사용될 수 있음

⑨ [CRE (3B-uridylylation site (bus), *cis*-acting replication element)]

- 매우 잘 보존된 stem-loop 구조로 55 nt 길이를 가지며 구제역바이러스 RNA 게놈 복제에 매우 중요
- 모든 picornavirus에서 loop 부위에 보존적으로 "AAACA" motif를 포함하는데, 이 motif는 VPg의 uridylylation의 template로 기능하여 3D를 통하여 VPgpU(pU)를 생성
- VPgpU(pU)은 구제역바이러스 RNA 합성을 개시하는 primer로 작용
- 다른 모든 Picornavirus의 CRE 서열은 단백질을 코딩하는 부위에 존재하지만, 구제역바이러스에서만 5'-UTR에 존재
- "AAACA" motif의 변형은 바이러스의 게놈 복제에는 영향을 주지만, 단백질 합성에는 영향을 주지 않음

⑩ [internal ribosome entry site (IRES) element]

- type II IRES element로서 약 450 nt의 길이를 가지며 진핵세포들이 일반적으로 단백질 합성에 사용하는 cap 구조를 사용하지 않는 단백질 합성 개시를 조절
- 5개의 RNA 구조 domain이 존재하고 다수의 stem-loop이 존재
- Domain II : polypyrimidine tract (UCUUU) 포함, polypyrimidine tract-binding protein (PTB) binding site 존재
- Domain III : GNRA, RAAA, C-rich loop 존재, GNRA의 G, A의 변형과 RAAA의 돌연변이는 IRES의 활성을 감소시킴
- Domain IV : A-rich internal bulges를 포함하는 2개의 stem-loop 구조로 구성되며 eIF4G(단백질 번역 개시 과정에 필수적인 인자)와 상호결합함
- Domain V : 보존된 hairpin-loop 부위를 가지며, polypyrimidine-rich tract 서열을 가짐. 바이러스 단백질 합성 시작에 중요하며 이 부분의 일부 돌연변이는 IRES 활성에 매우 큰 영향을 줌

⑪ **본 연구과제의 구제역바이러스 전파력 결정인자 분석 내용**

- CRE: 구제역바이러스 감염 종 특이성을 판별할 수 있는 특정 CRE RNA 2차 구조를 결정하는 RNA 서열 발굴
- VP1: 소와 돼지의 숙주종에 따라 다른 아미노산 구성을 가진 integrin 막 수용체 단백질에 차별적으로 결합하는 구제역바이러스 VP1 아미노산 구성 발굴
- 2C: 돼지 숙주세포내에서 소포체 스트레스를 유도하는 2C의 새로운 기능을 규명하고, 2C에 의한 소포체 스트레스 유도가 염증성 사이토카인 생성을 증가시킴을 규명함
- 3C: 국내 발생 구제역바이러스의 변이 3C 단백질에 따른 차별적인 protease 기능을 보이는 특정 아미노산 부위를 발굴함

3) 구제역바이러스의 종 특이성 분자진단 마커를 활용한 상용화 부분에 대한 계획

① 구제역바이러스 CRE 특정 서열 내용을 소와 돼지 감염을 구별하는 종 특이성 분자진단 마커 개발로 국내 특허 등록이 되었음

발송번호: 9-5-2021-016846802
발송일자: 2021.02.26.

수신 서울 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호(특허법인태백)
특허법인태백[정경욱] 귀하(귀중)
08506

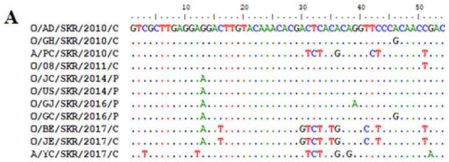
YOUR INVENTION PARTNER
특 허 청
특허결정서

출 원 인 **성 명** 부산대학교 산학협력단 외 1 명 (특허고객번호: 220040044843)
주 소 부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
대 리 인 **명 칭** 특허법인태백
주 소 서울 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호(특허법인태백)
지정된변리사 정경욱
발 명 자 **성 명** 정재훈
주 소 부산광역시 연제구 과정로343번길 43, 118동 602호 (연산동, 연산 자이)

② 특허등록을 토대로 아래와 같은 내용으로 상용화를 위한 계획을 진행함. 상용화 대상 기업은 진단전문업체인 ㈜ 젠라이프로서 현장용 진단키트 개발을 목표로 하고 있음

- 지금까지 국내외에서 구제역바이러스 감염진단 기술은 개발되었지만, 숙주동물종 특이성 바이러스 검출기술은 전무함
- 구제역바이러스 전체 8,500 염기서열에서 55개의 염기서열(CRE) 분석으로 숙주동물종 특이성을 판별할 수 있음
- CRE 영역의 특정 RNA 2차구조를 형성하는 RNA 특이서열 개발
- CRE의 55개 염기서열의 분석진단툴을 개발하면 4시간 이내에 구제역바이러스의 특이 숙주감염동물의 판별이 가능함

진단시스템 모델 예시



B

3	C		31-33	CTC		41	T	
	T	A/YC/SKR/2017/C		TCT	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/YC/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C		C	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C
12	A					42	T	
	T	A/YC/SKR/2017/C					C	A/PC/SKR/2010/C
13	G		35	C		43	C	
	A	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C O/GJ/SKR/2016/P O/GC/SKR/2016/P O/US/SKR/2014/P O/JC/SKR/2014/P		T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C		T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C
			36	A		46	A	
				G	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C A/YC/SKR/2017/C A/PC/SKR/2010/C		G	O/GC/SKR/2016/P O/GH/SKR/2010/C
16	C					51	C	
	T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C	38	A			T	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C O/SKR/08/2011/C A/PC/SKR/2010/C
30	A			G	A/YC/SKR/2017/C			
	G	O/BE/SKR/2017/C O/JE/SKR/2017/C	39	G		52	G	
				A	O/GJ/SKR/2016/P		A	A/YC/SKR/2017/C

4) 구제역바이러스 특이 항바이러스 물질의 활용에 대한 향후 계획

① 구제역바이러스 복제 저해제 후보물질인 SMA는 SMA 물질을 확보하고 있는 ㈜ AI Insight에 기술이전할 계획임

② z-gugglesterone은 이미 인체 대사질환 치료제로 활용되었기 때문에 물질의 안전성을 확보되어있음. in vivo 동물 적용 실험을 수행한 후 기술이전에 대해서 논의할 계획임

5) 신규 돼지 구제역백신 등의 개발에 이용할 수 있는 과학기술적 지식 제공

① 구제역바이러스 백신 바이러스주를 돼지에 주입하였을 때 돼지 생체 내에서 바이러스 copy number가 지속적으로 높게 유지가 되면 백신에 의한 면역능이 증가할 수 있을 것으로 기대됨. 본 연구에서 이용된 변이 바이러스주들 중에서 가장 높은 copy number를 생성하는 바이러스주의 유전자 서열을 DIVA 백신 개발에 활용할 수 있을 것임

Mutant	$TCID_{50}$/0.1ml
1 Cre T14G	$2.00*10^6$
2 Cre C42T	$5.00*10^6$
3 2C C248I	$2.50*10^6$
4 2C L287Q	$5.00*10^6$
5 3A T145P	$2.50*10^6$
6 3D A33E	$4.00*10^6$
7 3D S288R	$10.00*10^6$

② 아래 표와 그림 7-6에서 No.2의 신규 구제역바이러스 변이주가 돼지세포 감염과 돼지동물모델 감염에서 높은 바이러스 copy number를 보였음. 이 변이주의 신규 돼지 구제역 백신으로서 활용 가치를 분석할 수 있음

No.	Region	NA	AA	R-Shamir 기준
1	Cre	T14G		T614G
2	Cre	C42T		C642T
3	2C	C743T	T248I	C5151T
4	2C	TTG(859-861)CCA/CAG	L287Q	TTG(5267-5269)CCA/CAG
5	3A	ACC(433-435)CCC/CCT	T145P	ACC(5795-5797)CCC/CCT
6	3D	GCA(97-99)GAG/GAC/GAA	A33E/D	GCA(6770-6772)GAG/GAC/GAA
7	3D	AGC(865-867)CGC	S288R	AGC(7538-7540)CGC

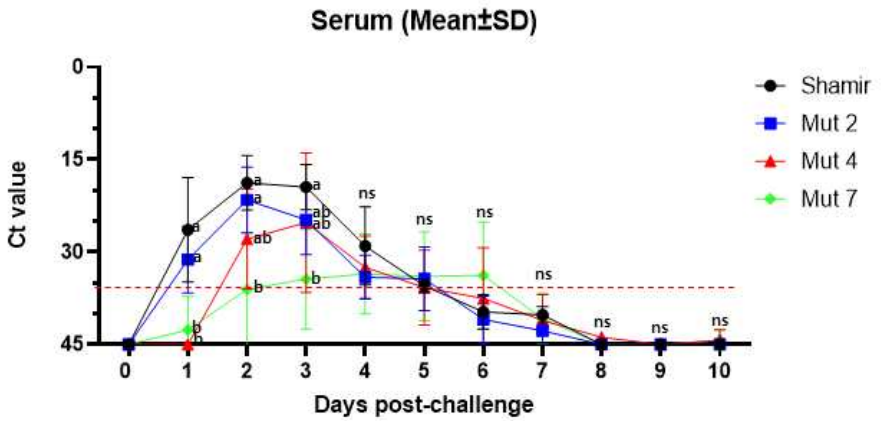


그림 7-6. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 혈액 내 바이러스 양 분석

6) 역유전학법으로 만들어진 바이러스와 국내에서 분리된 바이러스와의 병원성 비교실험

① 모든 접종 군에서 1-9dpc 사이에 발열, 수포, 식욕감퇴, 파행 등의 임상증상을 나타내었음. Wild type 바이러스 접종 군은 mutants 접종 군에 비하여 1-2일 증상이 빠르게 나타남을 확인하였음. 또한 mutants 바이러스 접종군 중 7번 바이러스 접종군 (n=1)과 wild type 바이러스 접종 군에서 폐사(n=1)가 있었음. 그중 wild type 바이러스 접종군의 폐사체의 경우 감염에 의한 것으로 밝혀졌음

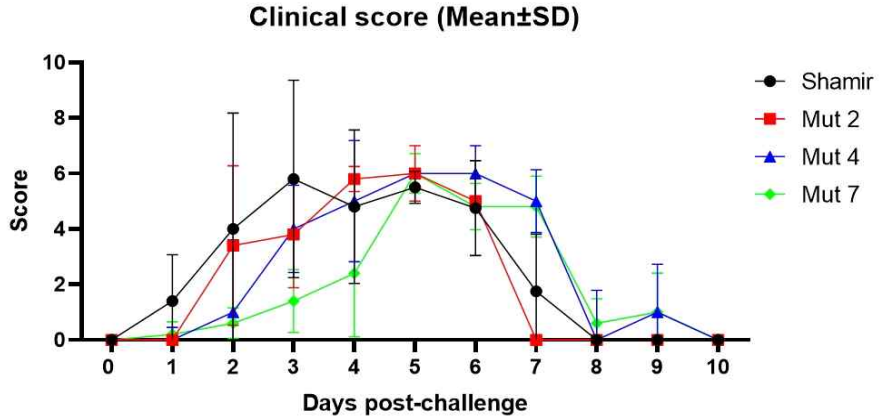


그림 7-7. 구제역바이러스 변이주들의 돼지 감염 후 임상증상 확인 분석

② 2017년 FMDV A 연천과 2018년 FMDV A 김포 바이러스 돼지 접종실험으로 숙주특정 단백질 특성 조사

- CXCR5 유전자의 발현 변화를 FMDV 돼지 접종 감염 조직을 이용하여 수행함. 그림 7-8에서 보듯이 3가지 다른 FMDV 감염 돼지 조직에서 단백질을 추출하여 Western blot 방법을 통해서 CXCR5 단백질 발현 차이를 확인함. CXCR5는 3가지 돼지 바이러스 접종 모델에서 병변이 확인된 혀조직에서 정상 조직에 비해서 3배 이상 단백질 생성이 증가함을 알 수 있었음

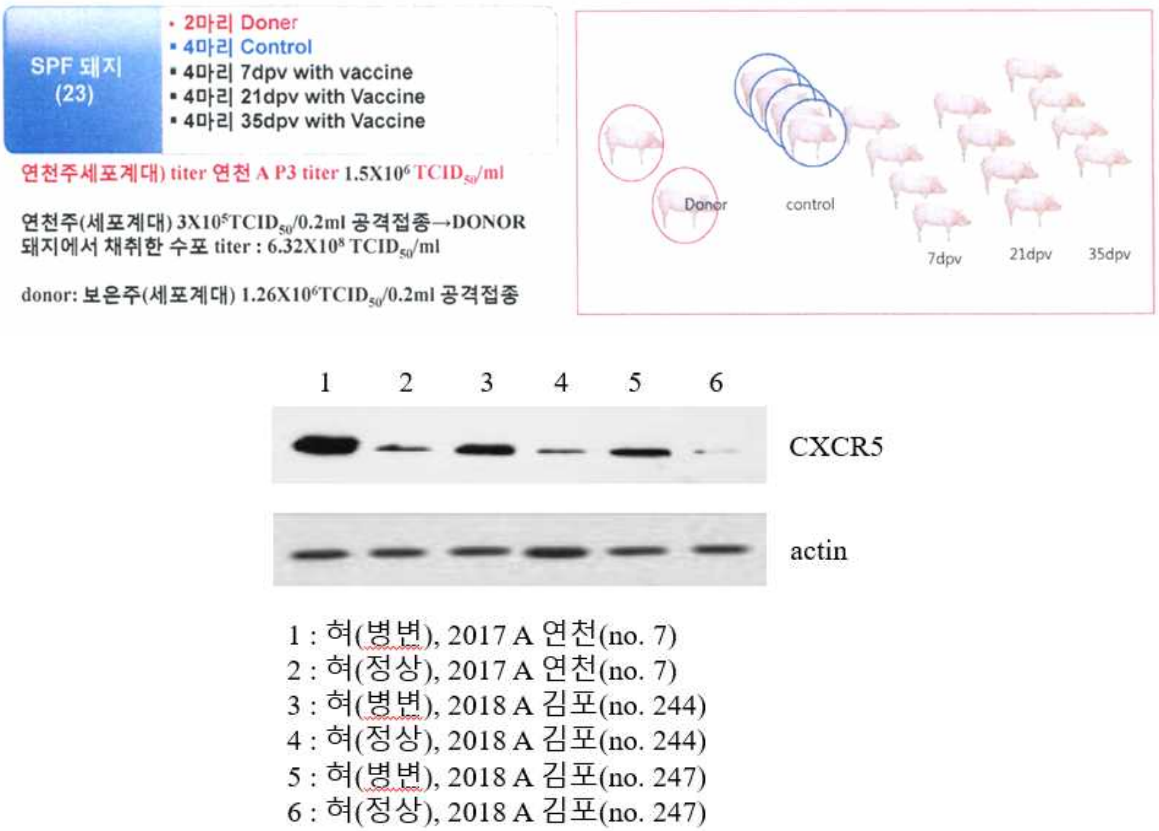


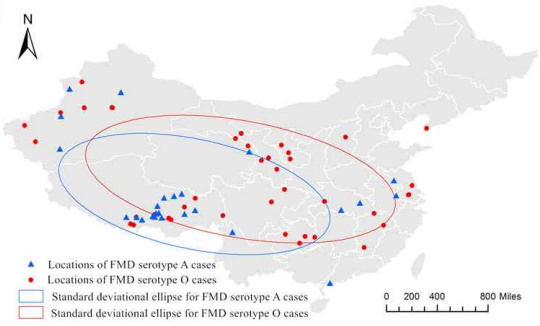
그림 7-8. FMDV A 바이러스 변이주를 접종한 돼지 임상 조직에서의 CXCR5 발현 변화 분석

③ 추후 연구에서 역유전학법으로 제작한 변이 바이러스와 국내 발생 바이러스주의 동시감염 실험을 이용하여 병원성 비교실험을 수행할 필요가 있음

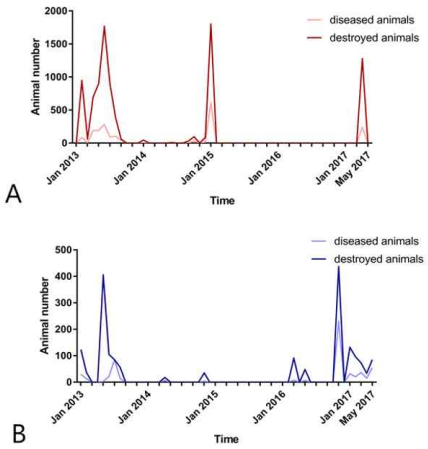
7) 국제공동연구에 대한 노력

① 중국의 anzhou Veterinary Research Institute의 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology and OIE/National Fand Mouth Disease Reference Laboratory와 공동연구를 계획 중에 있음

국제공동연구



2010-2018년 구제역 발생 지역으로서 매년 구제역 바이러스 감염이 발생하고 있음



중국의 사육두수는 돼지 4억 6천만, 소 8천4백만, 양 및 염소는 2억 8천만두 사육
우리나라는 돼지 1천1백만, 소 3백5십만
→ 중국의 돼지사육은 국내 보다 45배 이상 규모가 큼. 바이러스 종특이성 판별의 필요성과 가치가 사육규모와 비례하여 높음

② 2020년에 본 과제에서 도출된 구제역바이러스 CRE의 종 특이성 판별 마커 개발과 활용에 관한 중국 특허출원이 완료되었음

国 家 知 识 产 权 局

100036
北京市海淀区莲花池东路 39 号西金大厦 6 层西侧 605 室
北京品源专利代理有限公司 吕琳(010-63377188),田英爱
(010-63377266)

发文日：
2020 年 10 月 26 日

申请号或专利号：202011152831.2　　发文序号：202010260138880

专 利 申 请 受 理 通 知 书

根据专利法第 28 条及其实施细则第 38 条、第 39 条的规定，申请人提出的专利申请已由国家知识产权局受理。现将确定的申请号、申请日、申请人和发明创造名称通知如下：

申请号：202011152831.2
申请日：2020 年 10 月 26 日
申请人：釜山大学校产学协力团
发明创造名称：用于鉴别口蹄疫病毒感染宿主种类的生物标志物组合物

经核实，国家知识产权局确认收到文件如下：
发明专利请求书 每份页数:5 页 文件份数:1 份
说明书摘要 每份页数:1 页 文件份数:1 份
说明书附图 每份页数:4 页 文件份数:1 份
实质审查请求书 每份页数:1 页 文件份数:1 份
说明书 每份页数:8 页 文件份数:1 份
经证明的在先申请文件副本 每份页数:1 页 文件份数:1 份
在先申请文件副本中文题录 每份页数:1 页 文件份数:1 份
权利要求书 每份页数:2 页 文件份数:1 份 权利要求项数：12 项

提示：
1. 申请人收到专利申请受理通知书之后，认为其记载的内容与申请人所提交的相应内容不一致时，可以向国家知识产权局请求更正。
2. 申请人收到专利申请受理通知书之后，再向国家知识产权局办理各种手续时，均应当准确、清晰地写明申请号。
3. 国家知识产权局收到向外国申请专利保密审查请求书后，依据专利法实施细则第 9 条予以审查。

审 查 员：自动受理　　审查部门：专利局初审及流程管理部

200101 2019.11　纸件申请，回函请寄：100088 北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号　国家知识产权局受理处收
电子申请，应当通过电子专利申请系统以电子文件形式提交相关文件。除另有规定外，以纸件等其他形式提交的文件视为未提交。

8) 결과 미달성된 기술이전, 논문발표, 정책 활용에 대한 달성 계획

① 기술이전: 분자진단 전문기업인 ㈜ 젠라이프에 구제역바이러스 종 특이성 분자진단 마커를 활용한 진단시스템 기술이전을 협의하고 있음. 구제역바이러스 복제 저해제 후보물질인 SMA는 SMA 물질을 확보하고 있는 ㈜ AI Insight에 기술이전할 계획임

② 논문발표:

- "The cis-responsive element of Foot-and-mouth disease virus interacts with host cellular factor PCBP2 dependent on host specificity" 논문 제목으로 'Molecular Biology Reports' 저널에 투고 심사 중임
- 투고 준비중인 논문이 2편 있어서 최소한 올해 안으로 2편의 SCI급 논문이 출간될 예정임. 내용은 구제역바이러스 항바이러스 물질로 특허출원된 macrolactin A와 z-gugglesterone의 발굴과정과 항바이러스 기능에 관한 연구결과임
- 농림축산검역본부의 BL3 시설에서 수행중인 연구결과들이 올해 상반기 내에 도출될 것으로 예상되므로 올해 하반기에 투고 계획하는 논문이 2편 있음. 올해 말과 내년 초 까지 2편의 논문이 추가로 출간될 수 있도록 진행할 것임

③ 정책활용:

- 구제역바이러스의 전파력 결정인자들의 유전자 변이의 분자 역학 내용을 분석하여 역학 정책 수립에 활용할 수 있는 방안을 개발함

- 구제역바이러스 5'UTR 내에 있는 CRE RNA의 유전자 변이 내용을 이용하여 구제역바이러스 전파력과 감염능력이 다른 소와 돼지의 종특이성 감염 바이러스의 조기 진단 시스템을 구축할 수 있음. 이를 활용하여 초기 구제역바이러스 방역 대책 수립에 정보를 제공할 수 있음

- 구제역바이러스의 3D polymerase의 S288R, 2C 단백질의 L287Q, CRE C42T 유전자 변이는 구제역바이러스의 copy number를 증가시킬 수 있음. 신규 구제역바이러스의 동일 유전자 변이가 발생할 시 전파력이 강화된 구제역바이러스 출현을 예상하고 방역 대책에 활용할 수 있음

세부 정량적 연구개발성과 증빙자료 첨부

<논문 게재>_1-논문 제목

Journal of Life Science 2020 Vol. 30. No. 11. 947-955

ISSN (Online) 2287-3406
DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.11.947

Cis-acting Replication Element Variation of the Foot-and-mouth Disease Virus is Associated with the Determination of Host Susceptibility

Hyo Rin Kang[1], Mi So Seong[1], Bok Kyung Ku[2] and JaeHun Cheong[1]*

[1]*Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[2]*Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do 39660, Korea*

Received September 10, 2020 / Revised September 21, 2020 / Accepted September 28, 2020

The foot-and-mouth disease virus (FMDV), a member of the *Aphthocirus* genus in the Picornaviridae family, affects wild and domesticated ruminants and pigs. During replication of the FMDV RNA (ribonucleic acid) genome, FMDV-encoding RNA polymerase 3D acts in a highly location-specific manner. This suggests that specific RNA structures recognized by 3D polymerase within non-coding regions of the FMDV genome assist with binding during replication. One such region is the cis-acting replication element (CRE), which functions as a template for RNA replication. The FMDV CRE adopts a stem-loop conformation with an extended duplex stem, supporting a novel 15-17 nucleotide loop that derives stability from base-stacking interactions, with the exact RNA nucleotide sequence of the CRE producing different RNA secondary structures. Here, we show that CRE sequences of FMDVs isolated in Korea from 2010 to 2017 exhibit A and O genotypes. Interestingly, variations in the RNA secondary structure of the Korean FMDVs are consistent with the phylogenetic relationships between these viruses and reveal the specificity of FMDV infections for particular host species. Therefore, we conclude that each genetic clade of Korean FMDV is characterized by a unique functional CRE and that the evolutionary success of new genetic lineages may be associated with the invention of a novel CRE motif. Therefore, we propose that the specific RNA structure of a CRE is an additional criterion for FMDV classification dependent on the host species. These findings will help correctly analyze CRE sequences and indicate the specificity of host species for future FMDV epidemics.

Key words : CRE, FMDV, host susceptibility, RNA structure, virus variation

Introduction

The foot-and-mouth disease virus (FMDV), which causes severe vesicular disease in livestock, is a member of the *Aphthovirus* genus in the Picornaviridae family [2, 3]. The FMDV has high potential for antigenic and genetic variation; based on their induction of cross-protection in host animals, seven serotypes (A, O, C, Asia1, SAT 1, SAT 2, and SAT3) of FMDV have been identified [5, 20]. Additionally, advances in DNA sequencing have dramatically increased the rate at which genotypic and phenotypic variants of FMDV are identified [4].

Replication and translation of FMDV RNA occur in association with the cell membrane in the cytoplasm of infected cells. The most critical step of FMDV replication is RNA-dependent RNA synthesis by 3D polymerase, which requires a regulatory network involving viral-encoded proteins (3B and 3D), various host factors, and a non-coding structural RNA element. The 5' UTR contains two highly structured RNA sequences; the cloverleaf, required for genome replication, and the internal ribosome entry site, which directs translation initiation[8]. RNA replication is carried out on membranous structures by viral RNA-dependent RNA polymerase in conjunction with other viral and cellular proteins and cis-acting replication element (CRE) [10, 19]. The viral RNA structure is critical for several essential functions, including replication, translation, and encapsidation [14]. Determining the structure of viral RNA has broadened our understanding of its involvement in the viral infection cycle [9, 24].

Replication of the FMDV is initiated by the 3B protein, which acts as a primer [7]. Uridylylation by FMDV VPg occurs in a template-dependent manner and requires a small stem loop structure in the CRE as a natural template [17, 18, 22]. This reflects a common theme among many eukaryote-infecting viruses, which have evolved a variety of mechanisms to manipulate cellular transcription and trans-

*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.

<논문 게재>_1-사사 표시

was shown within the FMDV full genome. The highest gene variation was shown in the VP1 region, resulting from the development of viral escape by vaccine usage and the host immune response. Even though there is only a small portion (less than 8%) of the VP1 gene in the entire FMDV genome, it has been used in calculations of the phylogenetic relationship of FMDV variants, since the VP1 site is important for host cell attachment and entry. In addition, VP1 plays a critical role in the induction of the immune response and the determination of serotype specificity [5, 13]. The frequency of genetic variation of the non-coding region of the FMDV is lower than that of the coding region. CRE nucleotide substitutions show low rates of variation, but only one nucleotide variation within the CRE contributes to different RNA secondary structures for the recognition of CRE-binding proteins.

Here, we provide novel results regarding the epidemiological trends of FMDV outbreaks in Korea over a recent 10-year period, and provide viral determinants for host susceptibility. The endemic viruses from clinically infected animals showed different genetic variations dependent on the number of endemic years and the host species. Early identification of the host species of FMDV susceptibility can contribute toward efficient FMDV control programs, including vaccine application and quarantine countermeasures. The inter species transmission of FMDV between pig and cow might provide the genetic background of host specific susceptibility. However, in most of countries including Korea, since pig and cow farms were constituted of separated places, there were not research reports about FMDV inter-transmission of cow and pig. Generally, while cow might be highly infected by FMDV, pig could transmit FMDV stronger than cow.

The sequence-associated RNA secondary structure analysis of the FMDV CRE obtained from infected animal tissues may elucidate relationships between an outbreak and host susceptibility. Despite the presence of the same functional proteins in different host animals, the differential amino compositions of host cellular proteins may provide different CRE RNA recognition and discriminate in favor of specific host species for viral replication and transmission.

The pattern of genetic variation of the FMDV requires host adaptability for viral entry, intracellular replication, and establishment of the cytoplasmic viral assembly environment [11]. Accumulated information regarding the genetic variation of the FMDV may lead to the early determination of susceptible host species and provide molecular characteristics of emerging FMDV variants.

Acknowledgements

This work was supported by the Korean Animal and Plant Quarantine Agency (Z-1543082-2018-19-0102) and Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (320058-02).

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I. and Garland, A. 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* **129,** 1-36.
2. Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z. and Rodriguez, L. 2011. The pathogenesis of foot and mouth disease I: viral pathways in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **58,** 291-304.
3. Arzt, J., Baxt, B., Grubman, M., Jackson, T., Juleff, N., Rhyan, J., Rieder, E., Waters, R. and Rodriguez, 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.
4. Carrillo, C., Lu, Z., Borca, M. V., Vagnozzi, A., Kutish, G. F. and Rock, D. L. 2007. Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J. Virol.* **81,** 11341-11351.
5. Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, 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.
6. de Borba, L., Villordo, S. M., Iglesias, N. G., Filomatori, C. V., Gebhard, L. G. and Gamarnik, A. V. 2015. Overlapping local and long-range RNA-RNA interactions modulate dengue virus genome cyclization and replication. *J. Virol.* **89,** 3430-3437.
7. Ferrer-Orta, C., Agudo, R., Domingo, E. and Verdaguer, N. 2009. Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19,** 752-758.
8. Gao, Y., Sun, S. and Guo, H. 2016. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol. J.* **13,** 1-17.

<논문 게재>_2-논문 Desicion letter

The Journal of Veterinary Medical Science

Decision Letter (JVMS-21-0461.R2)

From: kmaeda@nih.go.jp

To: hrkang0@gmail.com, sms5237@daum.net, yimh@kiost.ac.kr, jlee@kiost.ac.kr, virusmania@korea.kr, molecule85@pusan.ac.kr

CC: jvms@ipec-pub.co.jp

Subject: The Journal of Veterinary Medical Science - Decision on Manuscript ID JVMS-21-0461.R2

Body:

5th March, 2022

Dear Professor Cheong:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Fibroblast growth factor 11 inhibits foot-and-mouth disease virus gene expression and replication in vitro" in its current form for publication in The Journal of Veterinary Medical Science. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of The Journal of Veterinary Medical Science, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Vice Editor-in-Chief
The Journal of Veterinary Medical Science
Ken Maeda
kmaeda@nih.go.jp

Editor's Comments to Author:
Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Reviewer(s)' Comments to Author:
Reviewer: 2

Comments to the Author
The manuscript by Kang et. al. has been revised well. This manuscript would be acceptable.

Reviewer: 1

Comments to the Author
Discussion has been well rewritten.
Additional virus titration studies have shown that FGF11 suppresses the replication of infectious viruses.

Date Sent: 04-Mar-2022

Close Window

<논문 게재>_2-

Fibroblast growth factor 11 inhibits foot-and-mouth disease virus gene expression and replication in vitro

Journal:	*The Journal of Veterinary Medical Science*
Manuscript ID	JVMS-21-0461.R2
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Kang, Hyo Rin; Pusan National University, Molecular biology Seong, Mi So; Pusan National University, Molecular biology Yim, Hyung-Soon; Korea Institute of Ocean Science & Technology, Marine Biotechnology Research Center Lee, Jung-Hyun; Korea Institute of Ocean Science & Technology, Marine Biotechnology Research Center Cha, Sang-Ho; Animal and Plant Quarantine Agency, Foot-and-Mouth Disease Research Division Cheong, JaeHun; Pusan National University, Molecular biology
Keywords:	antiviral drug, FGF11, FMDV, 5'UTR
Category:	Virology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<논문 게재>_2-publish 예정 안내 e-mail

From : JVMS_editorial_office <jvms@ipec-pub.co.jp>
To : "정재훈" <molecule85@pusan.ac.kr>
Cc :
Sent : 2022-03-29 10:18:29
Subject : RE: [RE]FW: The Journal of Veterinary Medical Science - JVMS-21-0461.R2

Dear Dr. Cheong,

Thank you for sending us the revised files.

The Advance Epub in J-STAGE will be released on April 5, and subsequently released in PubMed.
*Please note that the released Advanced Epub in J-STAGE cannot be changed in any reasons.

Your manuscript will appear in Vol. 84, No. 5 (online journal).
The volume and issue are tentative.
The formal release in J-STAGE and Pub-Med will be open after the whole editing processes finish.

I will send you the first page proof when it is ready.

Sincerely,

Yumiko IDE
Editorial Office
The Journal of Veterinary Medical Science
Email: jvms@ipec-pub.co.jp

<국내 및 국제 학술회의 발표>_1, 2 공통-학술대회 표지

<국내 및 국제 학술회의 발표>_1, 2 공통-초록집 해당 페이지

P1_65 The Difference of Host Susceptibility in Molecular Interaction Between Cellular Receptor and Structural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus

Hyo Rin Kang[1], Daae Park[1], Mi So Seong[1], Eun Ah Jang[1], Bok Kyung Ku[2] and Jaehun Cheong[1]*
[1]*Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[2]*Animal and Plant Quarantine Agency, Gyongsangbuk-do 39660, Korea*

P1_66 RNA-dependent RNA Polymerase of Foot-and-Mouth Disease Virus Directly Interacts with Protein Primer VPg for Viral Replication

Hyo Rin Kang[1], Daae Park[1], Mi So Seong[1], Eun Ah Jang[1], Bok Kyung Ku[2] and Jaehun Cheong[1]*
[1]*Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[2]*Animal and Plant Quarantine Agency, Gyongsangbuk-do 39660, Korea*

P1_67 Novel Phenoxypyrimidine Urea Derivative, 1-(3,5-dimethoxyphenyl)-3-(4-(3-methoxyphenoxy)-2-((4-morpholinophenyl)amino)pyrimidin-5-yl)urea Induces Apoptosis and Cytoprotective Autophagy in NSCLC Cells

Hyo-Sun Gil[1,2], Jeong-Hun Lee[1,2], Kyung-Sook Chung[1] and Kyung-Tae Lee[1,2]*
[1]*Department of Pharmaceutical Biochemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedae-ro, Seoul 02447, Korea*
[2]*Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedae-ro, Seoul 02447, Korea*

P1_68 All-trans Retinoic Acid Supplementation Promotes Preadipocyte Development in Sorted Bovine Stromal Vascular Cells

Dong Qiao Peng[1,2], Yong Ho Jo[1,2], Won Seob Kim[1], Jin Soo Park[1,2] and Hong Gu Lee[1,2]*
[1]*Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea*
[2]*Team of An Educational Program for Specialists in Global Animal Science, Brain Korea 21 Plus Project, Konkuk University, Seoul 05029, Korea*

P1_69 Physiological Responses According to Exercise Intensity in Halla Horses

Jongan Lee[1†], Ye-seong Lee[1†], Jae-Young Choi[1], Moon-Cheol Shin[1], Ji-Hyun Yoo[1] and Minjung Yoon[2]
[1]*Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea*
[2]*Department of Animal Science, Kyungpook National University, Sangju 37224, Korea*
[†]*Authors contributed equally.*

P1_70 Association Analysis of *MYH3* Genotypes with Meat Color Traits in the Crossbred (Landrace x Jeju native black pig) Pigs

Yong-Jun Kang, Sang-Geum Kim, Su-Yeon Kim, Moon-Cheol Shin, Jae-Young Choi, Jae-Hoon Woo, Nam-Geon Park, Byoung-Chul Yang and In-Cheol Cho*
Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea

P1_71 Development of Allele-specific PCR-based Method for Porcine Blood Types

Yong-Jun Kang, Sang-Geum Kim, Su-Yeon Kim, Moon-Cheol Shin, Jae-Young Choi, Jae-Hoon Woo, Nam-Geon Park, Byoung-Chul Yang and In-Cheol Cho*
Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea

P1_72 Association between *PDCD6*-VNTR Polymorphism and Urinary Cancer Susceptibility

Gi-Eun Yang and Sun-Hee Leem*
Department of Biological Sciences, Dong-A University, Busan 49315, Korea

P1_73 Analysis of Circulating-microRNA Expression Pattern in Lactating Cows under Heat stressed Conditions

Jihwan Lee[1†], Suhyun Lee[1†], Junkyu Son[1], Gulwon Jang[1], Hyeonju Lim[1], Euntae Kim[1], Donghyun Kim[1], Doosan Kim[1], Seunghwan Lee[2]* and Inchul Choi[2]*
[1]*Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheon-an 31000, Korea*
[2]*Department of Animal and Dairy Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea*
[†]*Authors contributed equally.*

P1_74 An Arabidopsis Nuclear ZFWD40 Protein, AtC3H59/ZFWD3, Is Involved in Seed Germination and Seedling Development

Hye-Yeon Seok[1], Hyoungjoon Bae[2], Syed Muhammad Muntazir Mehdi[2], Linh Vu Nguyen[2], Doai Van Nguyen[2], Sun-Young Lee[3] and Yong-Hwan Moon[1,2,4]*
[1]*Institute of Systems Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea*

<국내 및 국제 학술회의 발표>_3-참석확인증

Certificate of Attendance

This is to certify that
Jaehun Cheong
has attended the International Conference of Korean Society for Molecular and Cellular Biology which was held on Oct. 5 - Oct. 7, 2020

October 24, 2020

Jin Won Cho, Ph.D.
President
Korean Society for Molecular and Cellular Biology 2020

International Conference
KSMCB 2020
KOREAN SOCIETY FOR MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

COPYRIGHT © KOREAN SOCIETY FOR MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. ALL RIGTHS RESERVED.
The Korea Science Technology Center (Rm. 1105), 22, 7Gil, Teheran-ro, Gangnam-gu, Seoul 06130. Korea
Tel. 82-2-568-4490 | Fax. 82-2-558-0131 | home@ksmcb.or.kr | Business No. : 220-82-02592

<국내 및 국제 학술회의 발표>_4, 5 공통-학술대회 표지

<국내 및 국제 학술회의 발표>_4, 5 공통-학술대회 초록집 목차

P1_8 Cloning and Functional Characterization of Excitatory GABA-gated Cation Channel in Nematode
Junho Lee*
Department of Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

P1_9 A Metabolic Component of *Bacillus subtilis* Inhibits Transcription and Translation of Foot-and-Mouth Disease Virus Dependent on 5'-noncoding Regulatory Region
Hyo Rin Kang, Jeong A jang and JaeHun Cheong*
Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

P1_10 Specific Genetic Variation of Foot-and-mouth Disease Virus is Associated with Differential Virus Production
Hyo Rin Kang, Mi So Seong, Eun Ah Jang and JaeHun Cheong*
Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

P1_11 Effect of Mineral Supplementation on Blood Profile, Antioxidant Enzyme Activity and Heat Shock Protein in Heat-stressed Holstein
A-Rang Son, Seon-Ho Kim, Mahfuzul Islam and Sang-Suk Lee*
Department of Animal Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon 57922, Korea

P1_12 Environmental Factors Affecting Racing Performance in Jeju Race Horses
Jongan Lee[1], Jae-Young Choi[1], Sang-Min Shin[1] and Jung-Woo Choi[2]
[1]Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea
[2]College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

P1_13 Association Analysis of Between Racing Distance and Myostatin (MSTN) Gene Polymorphisms in Jeju Horses
Jae-Young Choi[1†], Yongook Jeong[1†], Jongan Lee[1], Hyunju Hong[1], Kwang-Yun Shin[2] and Nam-Young Kim[3*]
[1]Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, Jeju 63242, Korea
[2]Jeju Special Self-Governing Province Livestock Promotion Agency, 63078, Korea
[3]Planning and Coordination Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Korea
[†]Authors contributed equally.

P1_14 Korean Red Ginseng Improves Cardiac Hemodynamics through Regulation of Cardiac Gene Expression in db/db Mice
Mohammad Amjad Hossain, Jahangir Alam, Young-Jin Jang, Bumseok Kim and Jong-Hoon Kim*
College of Veterinary Medicine, Biosafety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea

P1_15 Cyclosporin A downregulates the $CD3^{-}CD161^{+}$ and $CD3^{+}CD161^{+}$lymphocytes
Mohammad Amjad Hossain, Jahangir Alam, Bumseok Kim and Jong Hoon Kim*
College of Veterinary Medicine, Biosafety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Korea

P1_16 Comparison of Heat Tolerance Between Holstein and Jersey Oocytes During in Vitro Maturation
Jihwan Lee[1], Junkyu Son[1], Doosan Kim[1], Jian Lee[1], Kyungsuk Lee[1], Donghyun Kim[1], Jinju Kim[1], Eunjung Choi[1], Gulwon Jang[1] and Inchul Choi[2]*
[1]Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheon-an 31000, Korea
[2]Department of Animal and Dairy Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

P1_17 Constitutive Active OsRab11 Increases Resistance to Salt Stress in Plant
Jae Bok Heo*
Department of Molecular Bioengineering, Dong-A University, Busan 49315, Korea

P1_18 Effect of Breast Cancer Metastasis-suppressor 1-like (BRMS1L) Genotype on Teat Number Traits in Pig Breed
Moon-Cheol Shin, Jae-Young Choi, Young-Jun Kang, Byoung-Chul Yang and In-Cheol Cho*
Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science RDA, Jeju 63242, Korea

P1_19 The Analytical Method of AO Blood Types Using Gene Structure in Pigs
Hyeon-Ah Kim, Moon-Cheol Shin, Ji-Hyun Yoo, Yong-Jun Kang, Sang-Geum Kim, Min-Ji Kim, Byoung-Chul Yang and In-Cheol Cho*
Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Jeju 63242, Korea

<국내 및 국제 학술회의 발표>_4, 5 공통-학술대회 초록집 해당 페이지

P1_9

A Metabolic Component of *Bacillus subtilis* Inhibits Transcription and Translation of Foot-and-Mouth Disease Virus Dependent on 5'-noncoding Regulatory Region

Hyo Rin Kang, Jeong A jang and JaeHun Cheong*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

The foot and mouth disease virus (FMDV), a member of the *Aphthovirus* genus in the Picornaviridae family, affects wild and domesticated ruminants and pigs. The FMDV is difficult to control and can be a major constraint on the international trade of livestock and animal products. During replication of the FMDV RNA genome, 3D polymerase acts in a highly location-specific manner. This suggests that specific RNA structures recognized by 3D polymerase within non-coding regions of the FMDV genome assist with binding during replication. One of the such regions is the cis-acting replication element (CRE), which has specific RNA 3D structures and functions as a template for RNA replication and uridylylation of Vpg (3B) protein. In this study, we developed a novel gene expression reporter construct for quantification of FMDV translation yield using 5' noncoding region of FMDV genome and luciferase gene. Appling this reporter constructs, we newly identified a macrolactin derivative to suppress the transcription and translation efficiency of 5'-noncoding regulatory element of FMDV in swine cell line. This finding lead to a novel preventing strategy of FMDV replication and transmission.

Key words: Foot-and-mouth disease virus, macrolactin, noncoding element, RNA replication, viral translation

P1_10

Specific Genetic Variation of Foot-and-mouth Disease Virus is Associated with Differential Virus Production

Hyo Rin Kang, Mi So Seong, Eun Ah Jang and JaeHun Cheong*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Foot-and-mouth disease (FMD), an acute highly contagious viral disease in susceptible cloven-hoofed animals, was described 100 years ago. The etiologic agent, FMD virus (FMDV), is a positive-sense, single-stranded RNA virus that belongs to the *Aphthovirus* genus, Picornaviridae family. The RNA virus genome of FMDV displays a very high mutation rate because the virus-encoded RNA polymerase lacks a proofreading mechanism. Genome RNA contains approximately 8.3 kb long and encodes a single long open reading frame (about 7 kb), which is flanked by along 5'-untranslated region (5'-UTR) and a short 3'-UTR. FMDV genome encodes 12 kinds of viral proteins; L, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C and 3D). In this study, we collected FMDV RNA sequences derived from FMDV infected animals in Korea and compared the RNA variation of FMDV according to functional sub-genomic region. We selected seven specific RNA variation in the Cre, 2C, 3A and 3D region and prepared FMDV variant containing each variation content. After host cell infection of each FMDV variant, we analyzed differential virus production. The results show that 3D amino acid variation makes highly increased viral copy number.

Key words: Foot-and-mouth disease virus, genetic mutant, viral replication, virus production

P1_11

Effect of Mineral Supplementation on Blood Profile, Antioxidant Enzyme Activity and Heat Shock Protein in Heat-stressed Holstein

A-Rang Son, Seon-Ho Kim, Mahfuzul Islam and Sang-Suk Lee*

Department of Animal Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon 57922, Korea

This study evaluated the beneficial effect of mineral supplementations to reduce heat stress in Holstein steers. For this, 3 Holstein steers were arranged in a 3×3 Latin square design with 3 treatment groups for 20days (including initial 14days for diet adaptation) per period. Treatments included Control (basal total mixed ration; TMR), T1 (basal TMR + Se 0.1 ppm + Zn 30 ppm + Cu 10 ppm), and T2 (basal TMR + Se 3.5ppm + Zn 350 ppm + Cu 28 ppm). On the last day of each period, blood samples were collected from jugular vein of steers before morning meal. The average recorded Temperature-humidity index during the feeding trial was 82.76± 1.80. Most of the blood chemistry were unaffected by mineral supplementations (p>0.05). The highest blood Se concentration was recorded in the T2 (p<0.05). The concentration of super-oxide dismutase (U/ml) was higher in T1 and T2 compared to the control, while T2 had the higher concentration of HSP27 and HSP70 compared to the control (p<0.05). Overall results suggest that supplementation of minerals packaged in the T2 can be used to prevent heat stress in Holstein steers.

Key words: Heat shock protein, heat-stress, Holstein steers, mineral supplementation

P1_12

Environmental Factors Affecting Racing Performance in Jeju Race Horses

Jongan Lee[1], Jae-Young Choi[1], Sang-Min Shin[1] and Jung-Woo Choi[2]

[1]*Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea*
[2]*College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea*

The aim of this study was to investigate environmental factors for racing performance in Jeju race horses at distance between 400 m and 1200 m. Total 48,603 racing data of 2,155 race horses recorded from the competitions held in Jeju horse racing park over a period 16 years (2002~2019) provided by Korea Racing Authority (KRA) were used in our study. Environmental factors affecting racing time at different distance were estimated with animal age at race, sex, weather condition, track condition, and horse weight. We performed one-way analysis of variance (ANOVA) to determine influences of environmental factors on racing time and Duncan's test for post hoc analysis. The racing time (p<0.01) was significantly affected by the weather condition except for the 1000 m and 1,110 m distance. As the weight of horse increased, the racing time (p< 0.001) was also reduced excluding the 1,200 m distance. Also, the track condition and sex difference has an effect on racing time (p<0.05) except for the 1,110 m and 1,200 m distance. These results suggest that the appropriate selection of environmental factors might be useful to improve racing performance.

Key words: Environmental factors, Jeju race horses, racing performance, racing time

<국내 및 국제 학술회의 발표>_6-학술대회 표지

BUENOS AIRES 2021
1 - 3 November 2021 | ARGENTINA

Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance

2021 Scientific Meeting

<국내 및 국제 학술회의 발표>_6-학술대회 초록집 해당 페이지

POSTER PRESENTATIONS: Virology

VIR-5: Fibroblast growth factor 11 inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus gene expression

Eun Ah Jang[1], Hyo Rin Kang[1], Mi So Seong[1], Jeong A Jang[1], JaeHun Cheong[1]

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

Foot-and-mouth disease (FMD) vaccine is the traditional way to protect against the disease. However, the use of FMD vaccines to protect early infection is limited. So, the alternative strategy of applying antiviral agents is required to control the transmission of FMDV in outbreak situations. Fibroblast growth factor 11 (FGF11) is a member of the intracellular FGF, in which shows a different function from other FGF11 superfamily. Here, we identified the inhibitory effect of FGF11 on FMDV gene expression. For the quantitative analysis of FMDV translation level, we constructed a plasmid reporter system conjugating luciferase encoding gene regulated by FMDV 5′ UTR region. FGF11 decreased the gene expression of this reporter in a dose-dependent manner. We further confirmed the inhibitory function of FGF11 on FMDV-infected cells through FMDV 3D gene reduction and suppression of cytopathic effect. These results indicate that FGF11 inhibits FMDV's function in vitro and in vivo, implicating to provide intervention strategy for FMDV pathogenesis and transmission.

<지식재산권>_1-특허 출원증

国家知识产权局

100036

北京市海淀区莲花池东路39号西金大厦6层西侧605室
北京品源专利代理有限公司 吕琳(010-63377188),田英爱
(010-63377266)

发文日：

2020年10月26日

申请号或专利号：**202011152831.2**　　发文序号：**2020102601388880**

专利申请受理通知书

根据专利法第28条及其实施细则第38条、第39条的规定，申请人提出的专利申请已由国家知识产权局受理。现将确定的申请号、申请日、申请人和发明创造名称通知如下：

申请号：202011152831.2
申请日：2020年10月26日
申请人：釜山大学校产学协力团
发明创造名称：用于鉴别口蹄疫病毒感染宿主种类的生物标志物组合物

经核实，国家知识产权局确认收到文件如下：
发明专利请求书 每份页数:5页 文件份数:1份
说明书摘要 每份页数:1页 文件份数:1份
说明书附图 每份页数:4页 文件份数:1份
实质审查请求书 每份页数:1页 文件份数:1份
说明书 每份页数:8页 文件份数:1份
经证明的在先申请文件副本 每份页数:1页 文件份数:1份
在先申请文件副本中文题录 每份页数:1页 文件份数:1份
权利要求书 每份页数:2页 文件份数:1份 权利要求项数： 12项

提示：

1. 申请人收到专利申请受理通知书之后，认为其记载的内容与申请人所提交的相应内容不一致时，可以向国家知识产权局请求更正。
2. 申请人收到专利申请受理通知书之后，再向国家知识产权局办理各种手续时，均应当准确、清晰地写明申请号。
3. 国家知识产权局收到向外国申请专利保密审查请求书后，依据专利法实施细则第9条予以审查。

审 查 员：自动受理　　审查部门：专利局初审及流程管理部

200101　纸件申请，回函请寄：100088 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号　国家知识产权局受理处收
2019.11　电子申请，应当通过电子专利申请系统以电子文件形式提交相关文件。除另有规定外，以纸件等其他形式提交的文件视为未提交。

BY20IM2210FBPC-CN

China National Intellectual Property Administration

100036	Dispatching Date:
Beyond Attorneys at Law F6, Xijin Centre, 39 Lianhuachi East Rd., Haidian District, Beijing 100036, China Attorney(s): Lin LV Yingai TIAN	October 26, 2020

Application No.: 202011152831.2 Dispatching No.: 2020102601388880

Official Filing Receipt for Patent Application

According to Article 28 of the Patent Law and Rules 38 and 39 of the Implementing Regulations thereof, China National Intellectual Property Administration (CNIPA) accepts the application filed by the applicant. The application number, application date, applicant and title of invention are notified as follows:

Application No.:	202011152831.2
Filing Date:	October 26, 2020
Applicant:	PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION
Title:	Biomarker composition for identifying host infection species of foot-and-mouth disease virus

Documents the CNIPA received are listed as follows:

Request of Patent Application for Invention:	5	pages each copy;	totally	1	copy
Abstract:	1	page each copy;	totally	1	copy
Drawings:	4	pages each copy;	totally	1	copy
Request for Substantive Examination:	1	page each copy;	totally	1	copy
Specifications:	8	pages each copy;	totally	1	copy
Certified Copy of Priority Document:	1	page each copy;	totally	1	copy
Chinese Bibliography of Priority Document:	1	page each copy;	totally	1	copy
Claims:	2	pages each copy;	totally	1	copy

Examiner: Process automatically

<지식재산권>_2-특허 등록증

특허증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 Patent Number: 제 10-2245638 호

출원번호 Application Number: 제 10-2019-0133382 호

출원일 Filing Date: 2019년 10월 25일

등록일 Registration Date: 2021년 04월 22일

발명의 명칭 Title of the invention

구제역바이러스 유전자의 특정 변이 부위를 이용한 구제역바이러스 감염숙주 종판별용 바이오마커 조성물

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2021년 04월 22일

QR코드로 현재기준 등록사항을 확인하세요

특허청장

COMMISSIONER,

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김 용 래

특허청

Korean Intellectual Property Office

<지식재산권>_3-특허 출원서

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2021.05.24
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2021-0066415 (접수번호 1-1-2021-0596012-22) (DAS접근코드E550)
출원인 명칭	경성대학교 산학협력단(2-2005-035316-1) 외 2명
대 리 인 성 명	특허법인 공간(9-2014-100141-0)
발 명 자 성 명	강재선 정재훈 강효린 김형희 박민희 황성우 이승재 황예진 김현우 최시훈
발 명 의 명 칭	마크로락틴 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 구제역 바이러스의 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-지식재산제도

<지식재산권>_3-특허 출원 보정서

【제출원인이 된 서류의 접수번호】 1-1-2021-0596012-22

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 이 발명을 지원한 국가연구개발사업

【보정방법】 정정

【보정내용】

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545023125

【과제번호】 320058022SB010

【부처명】 농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원

【연구사업명】 가축질병대응기술개발(R&D)

【연구과제명】 구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구

【기여율】 1/2

【과제수행기관명】 부산대학교 산학협력단

【연구기간】 2020.04.30 ~ 2021.12.31

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1465033123

【과제번호】 HR20C0026040021

【부처명】 보건복지부

【과제관리(전문)기관명】 한국보건산업진흥원

<지식재산권>_4-특허 출원서 1

관인생략

출원번호통지서

출원일자	2021.09.10
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2021-0120862 (접수번호 1-1-2021-1049790-63) (DAS접근코드6BD9)
출원인 명칭	부산대학교 산학협력단(2-2004-004484-3) 외 1명
대리인 성명	특허법인태백(9-2008-100101-3)
발명자 성명	정재훈 강효린 성미소 장은아 장정아 이정현 임형순 이경원 안영준 권개경 강성균 이현숙
발명의 명칭	구제역 바이러스에 대한 항바이러스 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : http://www.kipo.go.kr-지식재산제도

<지식재산권>_4-특허 출원서 2

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 4

【서열목록 전자파일】 미첨부

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545023125

【과제번호】 320058022S8010

【부처명】 농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원

【연구사업명】 가축질병대응기술개발(R&D)

<지식재산권>_4-특허 출원서 3

【연구과제명】 구제역 바이러스 숙주 전파력 결정 인자 발굴 및 억제기술 연구

【기여율】 1/1

【과제수행기관명】 부산대학교 산학협력단

【연구기간】 2021.01.01 ~ 2021.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인태백 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0	면	46,000 원
【가산출원료】	23	면	0 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	7	항	451,000 원

【합계】 497,000 원

【감면사유】 공공연구기관(50%감면)[1],전담조직(50%감면)[1]

【감면후 수수료】 248,500 원

【첨부서류】 1.기타첨부서류[부산대학교 산학협력단 / 위임장, 지분약정서]_1통 2.기타첨부서류[한국해양과학기술원 / 위임장, 지분약정서]_1통

1 : 기타첨부서류

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발 사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.