

Stable Expression of Bovine Integrin Beta-6 Increases Susceptibility of Goat Kidney Cell Line to Foot-and-mouth Disease Virus

Su-Mi Kim*, Se-Kyung Kim, Kwang-Nyeong Lee, Jong-Hyeon Park, Byoungnan Kim

Center for Foot-and-Mouth Disease Vaccine Research, Animal and Plant Quarantine Agency, 177 Hyeoksin 8-ro, Gimcheon-City, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

Corresponding

Su-Mi Kim

Center for Foot-and-Mouth Disease Vaccine Research, Animal and Plant Quarantine Agency, 177 Hyeoksin 8-ro, Gimcheon-City, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

Phone : +82-54-912-0907

Fax : +82-54-912-0890

E-mail : beliefsk@korea.kr

Received : February. 12, 2020

Revised : February. 24, 2020

Accepted : February. 26, 2020

The integrins $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 6$, and $\alpha\beta 8$ are known to be the natural receptors of foot-and-mouth disease virus (FMDV). Among them, integrin $\alpha\beta 6$ is considered a major receptor for FMDV. We performed protein expression of full-length bovine integrins α , $\beta 3$, and $\beta 6$ and confirmed the high efficiency of bovine $\alpha\beta 6$ as the FMDV receptor in FMDV non-permissive SW 480 cells. Next, we established the black goat kidney (BGK) cell line, stably expressing bovine integrin $\beta 6$ (BGK- $\beta 6$ -4). We observed that BGK- $\beta 6$ -4 cells had significantly enhanced sensitivity to FMDV compared with that of BGK cells ($P < 0.05$). In addition, BGK- $\beta 6$ -4 cells had equal or higher sensitivity to several serotypes of FMDV compared with that of other FMDV permissive cell lines, such as BHK-21 and IBRS-2. In conclusion, we established a promising novel goat cell line, BGK- $\beta 6$ -4, which can be used to isolate or culture FMDV. Furthermore, the BGK- $\beta 6$ -4 cell line may serve as a promising tool for studying integrin $\alpha\beta 6$ receptor functions.

Key Words: Foot-and-mouth disease virus, goat cell line, integrin $\alpha\beta 6$

INTRODUCTION

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

구제역(Foot-and-mouth disease)은 소, 돼지, 양을 포함한 우제류 동물에 감염되는 전 파속도가 매우 빠른 질병이다 (1). 원인체인 구제역바이러스(Foot-and-mouth disease virus)는 O, A, Asia1, South African Territories 1, 2, and 3 (SAT1, SAT2, and SAT3)의 7가지 혈청형을 가지고 있으며, 각 혈청형별로 다양한 바이러스 주(strain)가 존재한다 (2). 구제역 바이러스의 VP1 유전자 부분의 G-H loop는 수용체와 결합하는 리간드(ligand)로서의 역할을 하고, 구제역 바이러스는 세포의 인테그린(Integrin) heterodimer 수용체와 결합하게 된다 (3, 4). 구제역 바이러스의 분리 및 배양에 사용되는 BTY(primary bovine thyroid) 세포주는 인테그린 $\alpha\beta 6$ 가, IBRS-2 (swine kidney) 세포주는 인테그린 $\alpha\beta 8$ 가, BHK-21(baby hamster kidney) 세포주는 인테그린 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ 가 수용체로 사용되는 것으로 알려져 있다 (5-8). 이 중에서 인테그린 $\alpha\beta 6$ 가 소, 돼지와 같은 자연숙주 감염 시에 사용되는 수용체로 알려져 있으며, 구제역 바이러스의 세포 감염 시에도 인테그린 $\alpha\beta 6$ 에 대한 높은 의존도가 확인된 바 있다 (9, 10). 뿐만 아니라, 인테그린 $\alpha\beta 6$ 를 BHK-21 또는 LFBK (porcine kidney) 세포주에 발현하여 구제역 바이러스에 대한 세포 감수성을 높이는 연구가 보고되었다 (10-12). 우리는 이전에 확립되어 있던 대한민국 재래 산양 유래의 BKG (black goat kidney) 세포에서 구제역 바이러스 감염이 가능함을 확인한 바 있다 (13). 재래 산양 유래의 구제역 감수성 세포로서의 가치가 있으나 구제역 바이러스에 대한 감수성이 높지 않아 민감도를

Copyright © 2020 Journal of Bacteriology and Virology

©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/>).

높이기 위한 조치가 필요하였다. 이 연구에서는 소 인테그린(bovine integrin) α v, β 3, β 6의 전체 유전자를 클로닝하여 발현하고 구제역 바이러스의 수용체로서의 역할을 시험하였다. 뿐만 아니라, 소 인테그린 β 6 발현 플라스미드를 이용하여 BGK- β 6 세포주를 제작하고 구제역 바이러스에 대한 감수성을 비교하여 가장 우수한 세포주를 선발하였다. 이를 통해 구제역 바이러스에 대한 감수성이 우수한 재래산양 세포주를 확보함으로써 구제역 바이러스의 분리 및 배양에 효율적으로 사용하고자 하였다. 또한, 향후 소 인테그린 β 6를 비롯한 구제역 바이러스의 수용체와 리간드(ligand) 관련에 활용될 단백질을 확보함으로써 해당 연구의 토대를 마련하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

세포 및 바이러스

SW480 (Human colon carcinoma) 세포주는 한국 세포주 은행(Seoul, Republic of Korea)에서 분양 받았으며, RPMI 1640 배지 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 유지 및 배양하였다. BHK-21 (Baby hamster kidney-21), IBRS-2 (swine kidney) 세포주는 Dulbecco's modified Eagle's (D-MEM) 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 유지 및 배양하였다. BGK (black goat kidney) 세포주는 대한민국 재래산양에서 유래한 세포주로서 농림축산검역본부(Republic of Korea)에서 확립하였고, D-MEM 배지를 사용하여 유지 및 배양하였다 (13). 모든 배지는 10% FBS (Fetal bovine serum, pH 7.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 첨가하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포 배양하였다. 연구에 사용된 구제역 바이러스 O/SKR/2002 (GenBank Accession Number AH012984), O/Andong/SKR/2010 (GenBank Accession Number KC503937), A/SKR/Pocheon/2010 (GenBank Accession Number KC588943)은 농림축산검역본부에서 분리하였다. 구제역 바이러스 Asia1/MOG/05 (GenBank Accession Number EF614458)은 몽골중앙수의연구소(the State Central Veterinary Laboratory, Mongolia)에서 야외시료를 도입하여 농림축산검역본부에서 분리하였고, A22/IRQ 24/64 (GenBank Accession Number AY593763), Asia 1 Shamir (GenBank Accession Number JF739177), C3/Resende (GenBank Accession Number AY593807), SAT2/ZIM 5/81 (GenBank Accession Number EF134951), SAT3/ZIM 4/81 (GenBank Accession Number KX375417)은 OIE/FAO 구제역 표준연구소인 영국 퍼브라이트 연구소(Pirbright Institute, Woking, UK)에서 도입하였다. 이 연구에 사용된 구제역 바이러스의 계대 이력은 Table 1과 같으며, 바이러스의 역가는 Reed and Muench 방법을 이용하여 TCID₅₀로 측정하였다 (14). 모든 구제역 바이러스 접종시험은 농림축산검역본부의 생물안전3등급(Bio-safety level 3) 시설에서 수행되었다.

Table 1. Passage history of FMDV strains used in this study

FMDV strain	Passage history
O/SKR/2002	1 BHK21, 7 IBRS-2
A22/IRQ 24/64	2 BTY, 2 BHK-21, 1 BTY, 1IBRS-2
A/Pocheon/SKR/2010	1 IBRS-2, 4 BHK-21
Asia 1/MOG/05	2 BHK-21, 2 IBRS-2
C3/ Resende	2 BTY, 2 IBRS-2
SAT2/ZIM 5/81	3 BTY, 3 BHK-21
SAT3/ZIM 4/81	3 IBRS-2, 4 BHK-21

소 인테그린 α v, β 3, β 6의 클로닝

Signal peptide sequence를 포함하는 소 인테그린(bovine integrin) α v의 cDNA는 GenBank의 유전정보(Accession Number NM_174367)를 기반으로 유전자 합성을 의뢰하여 (Bioneer Corporation, Daejeon, Republic of Korea) 얻었으며, pEF5/FRT/V5/D-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 클로닝하고 pEF- α v로 지칭하였다. 소 인테그린 β 3와 β 6 유전자는 검역본부에서 구축된 bovine primary epithelial cell에서 유전자를 추출하여 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)하는 방법으로 얻었다. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA를 추출하고, oligo-(dT)₁₈ 프라이머, Superscript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 넣어 cDNA 를 제

작한 뒤 Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR에 사용된 프라이머는 *EcoR*I (sense primer)과 *Xho*I (antisense primer)를 포함하고 있으며, 소 인테그린 β3와 β6의 signal peptide가 포함되어 증폭되도록 디자인하여 제작되었다(Bioneer Corporation, Daejeon, Republic of Korea). 사용한 프라이머들의 염기서열은 Table 2와 같다. PCR product에 Taq polymerase를 넣어 72°C에서 10분간 반응시켜 A tail을 추가한 뒤 pcDNA3.1/CT-GFP-Topo vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 클로닝하고, pcDNA-β3와 pcDNA-β6로 지칭하였다. pcDNA-β3와 pcDNA-β6의 클로닝된 유전자는 염기서열분석을 통하여 확인하였다(MACROGEN, Seoul, Republic of Korea).

Table 2. Primer sequences used for PCR

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
β3 sense	CTAGCCTTT GAATTC ATGCGAGCGCGGCGGCTCTGGGCAGC
β3 antisense	AGTTGCAT CTCGAG CTAAGTGCCCTGTAGGTGATGTTG
β6 sense	CTAGCCTTT GAATTC ATGGGGATTGAAGTCTTGCCTGT
β6 antisense	AGTTGCAT CTCGAG CTATCCATCCGTGGAAAGATCAACC

Bold letters represent restriction enzyme sites (*EcoR*I site in sense primers and *Xho*I site in antisense primers)

인테그린 αv, β3, β6 단백질의 발현 확인

소 인테그린 αv가 클로닝된 플라스미드(pEF-αv)와 소 인테그린 β3 또는 β6가 클로닝된 플라스미드(pcDNA-β3, pcDNA-β6)를 Lipofectamine™ LTX and PLUS™ reagents (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 SW-480 세포에 transfection 하였다. 96 well 플레이트에 well 당 4×10⁴개의 SW-480 세포를 넣어 배양한 후, 다음날 200 ng의 pEF-αv와 200 ng의 pcDNA-β3 또는 pcDNA-β6를 co-transfection하였다. IFA (Indirect immunofluorescence assay) 방법으로 단백질을 확인하기 위하여, Transfection 48시간 후 70% (v/v) 아세톤(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 20분간 세포를 고정한 뒤 20분간 건조한다. PBS로 세포를 세척하고, 1:1000으로 희석한 1차 항체와 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 소 인테그린 αvβ6를 확인하기 위한 1차 항체로 mouse anti-human integrin β6 monoclonal antibody (CSβ6, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, αvβ3를 확인하기 위한 1차 항체로 mouse anti-human integrin αvβ3 monoclonal antibody (LM609, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 1차 항체 반응이 끝난 뒤 세포를 PBS로 세척하고 1:200으로 희석한 2차 항체를 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 1:200으로 희석한 secondary fluorescent-conjugated goat IgG fraction antibody against mouse IgG (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)를 사용하였다. 형광이미지는 Olympus IX70 inverted microscope (Olympus Life Science, Tokyo, Japan)와 Olympus U-TVO. 5x-C-3 카메라(Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하고 촬영하였다.

소 인테그린 αvβ6와 αvβ3를 발현시킨 SW480 세포에서 구제역바이러스 증식 비교

96 well 플레이트에 well 당 4×10⁴개의 구제역 바이러스에 감수성이 없는 세포인(non-permissive cell) SW-480 세포를 넣고 12시간 이상 배양한 후, 150 ng의 pEF-αv와 150 ng의 pcDNA-β3 또는 pcDNA-β6를 co-transfection하였다. transfection 24시간 후 세포에 10^{5.5} TCID₅₀/ml의 구제역 바이러스 O/SKR/2002, Asia 1/MOG/05, A22/IRQ24/64를 well 당 100 μl씩 접종하였다. 바이러스 접종 8일 후 상층액을 수집하여 viral RNA를 추출 후 real-time RT-PCR을 실시하였다. Viral RNA는 the MagNA Pure 96 automation system (Roche, Basel, Switzerland)와 MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 추출하였고, real-time RT-PCR은 이전 연구의 방법을 따랐다 (15).

소 인테그린 β6를 보유한 BGK 세포주 제작

96 well 플레이트에 well 당 3×10⁴개의 BGK 세포를 넣어 배양하고, 다음날 부착된 세포가 70% 가량 되었을 때 25 ng의 pcDNA-β6를 transfection하였다. 5 mg/ml의 Geneticin, G418 antibiotics (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 넣은 배지를 사용하여 소 인테그린 β6를 보유한 세포만을 선택하였다. 선택된 세포를 5 mg/ml의 Geneticin, G418 antibiotics 포함 배지로 10배 단계 희석하여 1개의 세포를 얻고, 다시 증식시켜 최종 4개의 세포주를 획득하였다.

BGK별 구제역 바이러스에 대한 감수성 시험

선발된 4개의 BGK세포주(BGK- β 6-1, BGK- β 6-2, BGK- β 6-3, BGK- β 6-4)를 증식시키고, BGK, IBRS-2 세포를 함께 준비하였다. 96 well 플레이트에 well 당 3×10^4 개의 세포를 넣어 배양하고, 다음날 구제역 바이러스 O/SRK/2002와 C3 Resende를 10배 단계희석 후 접종하고 72시간 후 각 세포주에서의 역가를 비교하였다. BGK- β 6-4 세포주의 구제역 바이러스에 대한 감수성을 알아보기 위하여 BGK- β 6-4, BGK, BHK-21, IBRS-2 세포를 준비하였다. 구제역 바이러스 A22/IRQ 24/64, A/Pocheon/SKR/2010, Asia 1/MOG/05, SAT2/ZIM 5/81, SAT3/ZIM 4/81를 사용하여 앞에서 언급한 바와 동일하게 각 세포주에서의 역가를 비교하였다. 역가는 Reed and Muench 방법을 이용하여 TCID₅₀로 측정하였다 (14).

통계학적 분석

통계학적 분석을 위하여 GraphPad InStat software (version 3.05; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 Unpaired t-test를 실시하였다. P-values가 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 간주하였다.

RESULTS

클로닝된 인테그린 α v, β 3, β 6의 발현 확인

클로닝된 인테그린 단백질의 발현을 확인하기 위해 SW480 세포에서 plasmid를 transfection한 후 IFA 실험을 실시하였다 (Fig. 1). pEF- α v와 pcDNA- β 3를 co-transfection한 세포와 pEF- α v와 pcDNA- β 6를 co-transfection한 세포에서 형광이 관찰되어, 소 인테그린 β 6와 β 3 단백질의 발현을 확인하였다. 또한, 인테그린 heterodimer에 반응하는 인테그린 α v β 3 항체를 사용함으로써 인테그린 α v 단백질의 발현도 동시에 확인하였다 (Fig. 1b).

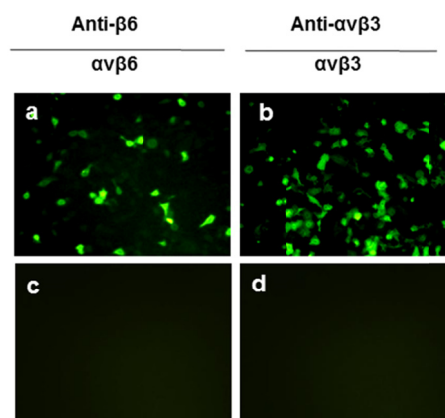


Figure 1. Detection of bovine integrins α v β 3 and α v β 6 heterodimer expression in SW480 cells using indirect immunofluorescence assay (IFA). SW-480 cells were co-transfected with vectors expressing bovine α v and β 6 (a) or β 3 (b) subunits. Protein expression was detected by IFA after 48 h of transfection using an anti-human β 6 Mab (2076Z) (a) or an anti-human integrin α v β 3 Mab (LM609) (b). Untransfected cells treated with the same primary and secondary antibodies were used as negative controls (c and d).

소 인테그린 α v β 3와 α v β 6 발현 세포에서의 구제역 바이러스에 대한 감염효율 비교

구제역 바이러스에 대한 감수성이 없는 세포인 SW480 세포에서 소 인테그린 α v β 3와 α v β 6가 발현하도록 pEF- α v와 pcDNA- β 3 또는 pcDNA- β 6를 co-transfection하여 구제역 바이러스 감염 효율을 비교하였다(Fig. 2). 그 결과 구제역 바이러스 O/SKR/2002, A22/IRQ 24/64, Asia/MOG/05 모두에서 소 인테그린 α v β 3 발현 세포에서보다 소 인테그린 α v β 6 발현 세포에서 높은 바이러스 copy 수가 관찰되었다($P < 0.05$). 반면 구제역 바이러스 A22/IRQ 24/64, Asia/MOG/05를 감염시킨 경우에는 소 인테그린 α v β 3

를 보유한 세포에서 구제역 바이러스 증식이 관찰되었으나, 구제역 바이러스 O/SKR/2002를 사용한 경우에는 바이러스 증식이 관찰되지 않았다.

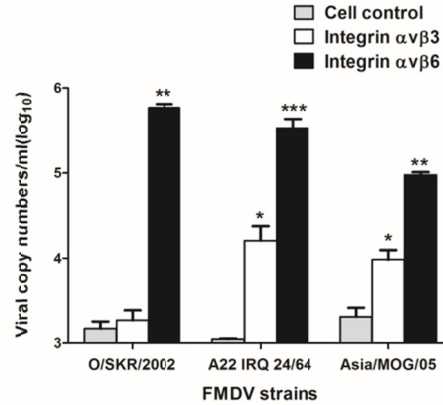


Figure 2. Comparison of viral infection efficiency in the cells expressing bovine αvβ3 and αvβ6 integrins. SW480 cells were co-transfected with vectors expressing bovine αv and β6 or β3 subunits. Twenty-four hours after transfection, the cells were infected with $10^{4.5}$ TCID₅₀ of FMDV O/SKR/2002, Asia 1/MOG/05, or A22/IRQ 24/64 viral suspensions. The supernatant was collected at 8 days after the infections, and viral RNA was extracted. FMDV quantification was performed using real-time RT PCR. An unpaired t-test was performed for statistical analysis by GraphPad InStat software (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Error bars indicate standard deviations from the mean.

구제역 바이러스에 대한 감수성이 높은 BGK-β6 세포주의 선정

소 인테그린 β6를 보유한 4개의 BGK 세포주와 BGK 세포, IBRS-2 세포에서의 구제역 바이러스의 역가를 비교하여 가장 감수성이 우수한 BGK-β6 세포주를 선정하였다(Fig. 3). 구제역 바이러스 O/SKR/2002에 대한 역가를 비교하였을 때, BGK-β6-4 세포주의 감수성이 나머지 3개의 BGK-β6 세포주와 BGK 세포보다 우수하였고($P < 0.01$), IBRS-2 세포와 동등한 수준이었다. 구제역 바이러스 C3 Resende에 대한 역가를 비교하였을 때, BGK-β6-4와 BGK-β6-3 세포주의 감수성이 나머지 2개의 BGK-β6 세포주, BGK 세포주, IBRS-2 세포주보다 우수하였다($P < 0.05$).

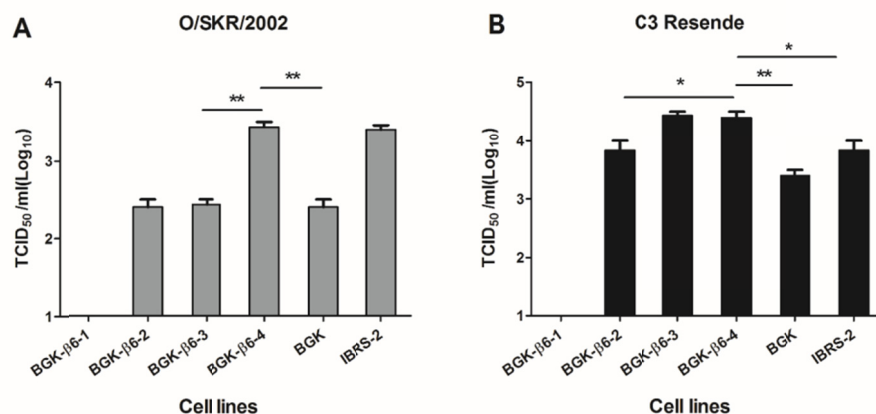


Figure 3. Comparative virus titration in BGK-β6 stable cell lines. Four stable BGK cell lines, expressing bovine integrin β6 (BGK-β6-1, BGK-β6-2, BGK-β6-3, and BGK-β6-4), in addition to BGK and IBRS-2 cell lines were used for titrating FMDV O/SKR/2002 or C3 Resende. Virus titration was measured 72 h post FMDV infection. TCID₅₀ was calculated by Reed and Muench method (14). An unpaired t-test was performed for statistical analysis by GraphPad InStat software (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Error bars indicate standard deviations from the mean.

BGK-β6-4 세포주의 다양한 혈청형의 구제역 바이러스에 대한 민감도

구제역 바이러스 O/SKR/2002, C3 Resende에 대해 가장 높은 민감도를 보인 BGK-β6-4 세포주를 다양한 혈청형의 구제역 바이러스 역가 측정에 적용하였다(Fig. 4). BGK-β6-4세포주는 Fig. 4의 구제역 바이러스 SAT2/ZIM 4/81를 제외하고 실험에서 사용된 모든 바이러스에 대해서 BGK 세포주보다 더 높은 민감도를 가지고 있었다($P < 0.05$). A22/IRQ 24/64와 A/Pocheon/SKR/2010에 대해서는 BHK-21, IBRS-2 세포주와 비교하였을 때에도 높은 민감도를 확인하였다($P < 0.05$). 또한 구제역 바이러스 Asia1/MOG/05와 SAT2/ZIM 5/81HK-21의 역가를 측정하였을 때에는 IBRS-2와 BHK-21 세포주보다 높거나($P < 0.05$) 동등한(statistically not significant) 역가 측정 결과를 확인하였다. 그러나 SAT3/ZIM 4/81 바이러스의 경우 모든 세포주에서 측정된 바이러스 역가 차이는 통계학적 유의성이 없었다($P > 0.05$).

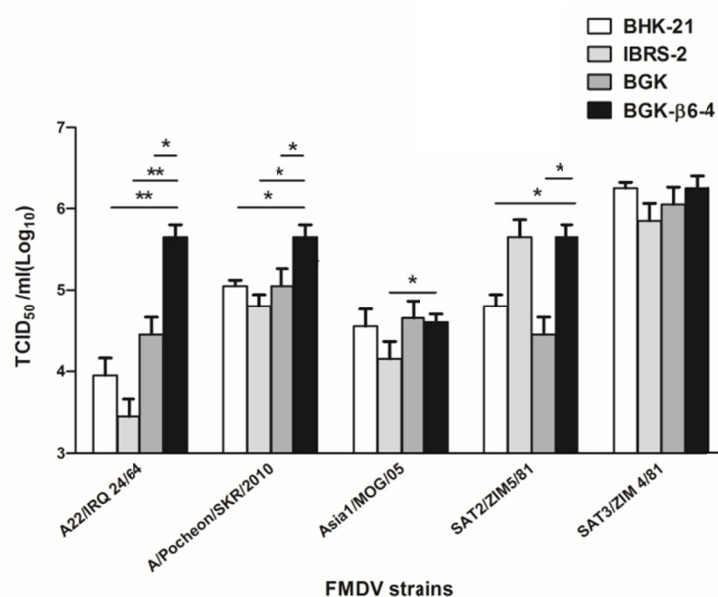


Figure 4. Comparative titration of various strains of FMDV in BGK-β6-4, BGK, IBRS-2, and BHK-21 cell lines. BGK-β6-4, BGK, IBRS-2, and BHK-21 cell lines were used for titrating FMDV A22/IRQ 24/64, A/Pocheon/SKR/2010, Asia1/MOG/05, SAT2/ZIM 5/81, and SAT3/ZIM 4/81. Virus titration was measured 72 h post FMDV infection. TCID₅₀ was calculated by Reed and Muench method (14). An unpaired t-test was performed for statistical analysis by GraphPad InStat software (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Error bars indicate standard deviations from the mean.

DISCUSSION

구제역 바이러스의 수용체로 실질적으로 사용되는 세포막 당단백질은 인테그린 heterodimer인 $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$ 로 알려져 있다 (16). 이중에서 인테그린 $\alpha\beta 6$ 는 특이적으로 상피 조직에서 높은 수준으로 발현되어 구제역 바이러스의 감염과 증식에 결정적인 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 (17). 또한 이전의 연구에서 SW 480이나 CHO (Chinese hamster ovary) 세포와 같은 구제역 바이러스에 감수성이 없는 세포에서 인테그린 $\alpha\beta 6$ 또는 $\alpha\beta 3$ 을 발현하여 구제역 바이러스 감염시험을 실시한 바 있고, 구제역 바이러스 감염에서의 $\alpha\beta 6$ 의 중요성은 더욱 대두되었다 (9, 18, 19). 이 연구에서는 구제역 바이러스에 가장 민감한 세포인 BTY (primary bovine thyroid) 세포에서 가장 높은 수준으로 발현되는 수용체인 소 인테그린 $\alpha\beta 6$ 를 산양 유래 세포에 이용함으로써 구제역 바이러스에 대한 세포의 민감도를 높이고, 소 유래 시료에서 구제역 바이러스 분리 시에 더 높은 효율을 기대할 수 있도록 하였다 (20).

인테그린 α , $\beta 6$, $\beta 3$ 는 온전한 단백질을 얻기 위해 signal sequence를 포함한 전체 유전자를 사용하였다. 단백질 확인 시에는 소 인테그린에 대한 상용항체가 존재하지 않았기 때문에 사람 인테그린 항체를 대체하여 사용하였고, 이전의 연구에서 보고된 바와 같이 일부 상용 항체는 소 인테그린 확인에 적합하지 않아 여러 번의 적용시험이 필요하였다 (10). 우리는 구조적으로 2개

의 subunit가 복합체를 이루는 특성을 고려하여 conformational epitope을 인지하는 항체를 이용하여 IFA 방법으로 단백질을 확인하였다 (Fig. 1).

인테그린 $\alpha \nu \beta 6$ 와 $\alpha \nu \beta 3$ 를 SW 480 세포에 transfection한 뒤 구제역 바이러스를 접종함으로써 제작한 단백질이 기능적으로 잘 작동하는지 확인하였다(Fig. 2). 이전의 보고와 같이 O, A, Asia 1 혈청형의 구제역 바이러스 모두에서 인테그린 $\alpha \nu \beta 6$ 에 대한 선호도가 인테그린 $\alpha \nu \beta 3$ 에 대한 선호도 보다 높았으나, 그 정도는 바이러스마다 다르게 나타났다 (9). SW480 세포는 구제역에 감수성이 없기 때문에(non-permissive) 바이러스 접종 후 접종액을 제거하고 3일 이내에 결과를 분석했을 경우 구제역 바이러스 copy number가 지나치게 낮게 측정되어 인테그린 간의 효율 비교가 어려웠다. 따라서 구제역 바이러스 접종 후 상층액을 그대로 두고 8일간 배양하여 결과를 얻게 되었다.

BGK 세포는 대한민국 재래산양에서 유래한 세포로서 다양한 동물종의 세포주를 이용하고자 할 때 유용하기는 하나, 다른 구제역 증식용 세포보다 감수성이 낮은 경향을 보였다 (13). 이 연구에서는 바이러스 민감도가 낮은 BGK 세포에 인테그린 $\alpha \nu \beta 6$ 가 발현하도록 세포주를 제작하였다. 먼저 BGK 세포에 hygromycin과 Geneticin(G418)의 2가지 항생제를 사용하여 pEF- $\alpha \nu$ 와 pcDNA- $\beta 6$ 를 모두 보유한 세포주를 선택하고자 시도하였으나, 2가지 항생제를 적용하여 세포주화 되지 않는 현상이 관찰되었다. 이후 BGK 세포에 pcDNA- $\beta 6$ 만을 transfection하고 G418 항생제를 이용하여 세포주를 제작하였고, 민감도가 향상된 세포주 BGK- $\beta 6$ -4를 확립하였다. 소 인테그린 $\beta 6$ 의 발현만으로 구제역 바이러스에 대한 민감도가 향상된 것은 BGK 세포의 산양 인테그린 $\alpha \nu$ 가 소 인테그린 $\beta 6$ 와 정상적으로 heterodimer를 이루어 수용체로서의 역할을 한 것으로 예상된다. 이전의 연구에서 사람의 인테그린 $\alpha \nu$ subunit와 소의 인테그린 $\beta 3$ subunit는 효율의 차이를 보이는 하지만 정상적으로 heterodimer를 이루는 것이 보고된 바 있으며 (21), 서로 다른 종 유래의 인테그린 $\alpha \nu$ subunit와 $\beta 6$ subunit의 heterodimer 형성도 문제없이 일어날 것으로 예상된다. 현재까지 인테그린 $\alpha \nu$ 와 $\beta 6$ 를 함께 세포에 발현시키는 방법으로 세포주의 민감도를 높이는 연구가 보고된 바 있으나 (10-12). 이 연구에서는 인테그린 $\beta 6$ 의 도입만으로도 인테그린 $\alpha \nu \beta 6$ 수용체를 형성시켜 민감도를 향상시킬 수 있었다.

2가지 혈청형의 구제역 바이러스를 이용하여 역가를 측정된 결과로 BGK- $\beta 6$ -4 세포주를 민감도가 가장 우수한 세포주로 결정하였다(Fig. 3). Fig. 3과 Fig. 4에서 관찰되듯이 BGK- $\beta 6$ -3, BGK, BHK-21에서와 같이 세포주별로 다양한 구제역 바이러스에 대한 민감도가 다르게 나타났는데, 이것은 구제역 바이러스의 혈청형, 세포계대 이력, 동물종에 대한 선호도 등 바이러스 특성에 따른 수용체 선호도 차이로 해석된다 (9). 그럼에도 불구하고, BGK- $\beta 6$ -4 세포주는 다양한 구제역 바이러스마다 차이를 크게 보이지 않는 우수한 민감도를 보여주었다(Fig. 4). 다만 구제역 바이러스 SAT 3/ZIM 4/81는 세포별로 역가 차이를 보이지 않았다. SAT 3/ZIM 4/81는 세포 적응된 구제역 바이러스가 획득하는 Heparan sulphate 수용체 보유 실험에서는 음성 결과를 보였으므로 (data not shown), 세포주에 공통으로 존재하는 새로운 수용체 획득에 의한 것이 아닌 바이러스의 고유특성에 의한 것으로 예상된다 (22). BGK- $\beta 6$ -4를 야외 구제역 바이러스의 분리시에 활용하기 위해 향후 다양한 야외 시료에 대한 감염 실험이 필요할 것으로 생각된다.

이 연구에서는 소 인테그린 단백질을 발현시켜 감수성을 높인 새로운 산양세포 BGK- $\beta 6$ -4를 확립하였다. 우리가 확립한 새로운 세포는 다양한 구제역 바이러스의 감염과 배양 실험에 사용될 수 있으며, 뿐만 아니라 인테그린 수용체에 대한 연구에도 적극 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGMENTS

이 연구는 농림축산검역본부(Animal and Plant Quarantine Agency, Republic of Korea)의 농림축산검역검사기술개발 시험연구 예산으로 추진되었습니다.

REFERENCES

- 1) Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:465-93.
- 2) Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 2003;91:65-80.

- 3) Baxt B, Becker Y. The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* 1990; 4:73-83.
- 4) Fox G, Parry NR, Barnett PV, McGinn B, Rowlands DJ, Brown F. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* 1989;70:625-37.
- 5) Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, Mason PW, Baxt B. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* 1995; 69:2664-6.
- 6) Amadori M, Volpe G, Defilippi P, Berneri C. Phenotypic features of BHK-21 cells used for production of foot-and-mouth disease vaccine. *Biologicals* 1997;25:65-73.
- 7) Johns HL, Berryman S, Monaghan P, Belsham GJ, Jackson T. A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol* 2009;83:6247-56.
- 8) Koyama T, Hughes RC. Functional integrins from normal and glycosylation-deficient baby hamster kidney cells. Terminal processing of asparagine-linked oligosaccharides is not correlated with fibronectin-binding activity. *J Biol Chem* 1992; 267:25939-44.
- 9) Duque H, Baxt B. Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine α_v integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol* 2003;77:2500-11.
- 10) Duque H, LaRocco M, Golde WT, Baxt B. Interactions of foot-and-mouth disease virus with soluble bovine $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_6$ integrins. *J Virol* 2004; 78:9773-81.
- 11) LaRocco M, Krug PW, Kramer E, Ahmed Z, Pacheco JM, Duque H, *et al.* A continuous bovine kidney cell line constitutively expressing bovine $\alpha_v\beta_6$ integrin has increased susceptibility to foot-and-mouth disease virus. *J Clin Microbiol* 2013;51:1714-20.
- 12) LaRocco M, Krug PW, Kramer E, Ahmed Z, Pacheco JM, Duque H, *et al.* Correction for LaRocco *et al.*, A continuous bovine kidney cell line constitutively expressing bovine $\alpha_v\beta_6$ integrin has increased susceptibility to foot-and-mouth disease virus. *J Clin Microbiol* 2015;53:755.
- 13) Lee SY, Lee YJ, Kim RH, Park JN, Park ME, Ko MK, *et al.* Rapid engineering of foot-and-mouth disease vaccine and challenge viruses. *J Virol* 2017; 91:e00155-17.
- 14) Reed LI, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Epidemiol* 1938;27:493-7.
- 15) Kim SM, Lee KN, Lee SJ, Ko YJ, Lee HS, Kweon CH, *et al.* Multiple shRNAs driven by U6 and CMV promoter enhances efficiency of antiviral effects against foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res* 2010;87:307-17.
- 16) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- 17) O'Donnell V, Pacheco JM, Gregg D, Baxt B. Analysis of foot-and-mouth disease virus integrin receptor expression in tissues from naïve and infected cattle. *J Comp Pathol* 2009;141:98-112.
- 18) Jackson T, Sheppard D, Denyer M, Blakemore W, King AM. The epithelial integrin $\alpha_v\beta_6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 2000;74:4949-56.

- 19) Wang Y, Mao Q, Chang H, Wu Y, Pan S, Li Y, *et al.* Inability of FMDV replication in equine kidney epithelial cells is independent of integrin $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 6$. *Virology* 2016; 492:251-8.
- 20) Burman A, Clark S, Abrescia NG, Fry EE, Stuart DI, Jackson T. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for $\alpha\beta$ integrins. *J Virol* 2006; 80:9798-810.
- 21) Neff S, Mason PW, Baxt B. High-efficiency utilization of the bovine integrin $\alpha\beta 3$ as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine $\beta 3$ subunit. *J Virol* 2000;74:7298-306.
- 22) Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, Andreu D, Beck E, Domingo E. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* 2000;74:1641-7.