

Coxsackievirus B3의 VP2 부분에 대한 Peptide 항체 개발

가톨릭대학교 생명공학부 분자바이러스연구실¹, 울산대학교 의과대학 미생물학교실²

정수영¹ · 조영주¹ · 김연정¹ · 김대선¹ · 이희란² · 남재환^{1*}

Development of Peptide Antibody against Coxsackievirus B3 VP2

Soo-Young Chung¹, Young-Joo Cho¹, Yeun-Jung Kim¹, Dae-Sun Kim¹,
Heuiran Lee² and Jae-Hwan Nam^{1*}

¹Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1 Yeoksok Dong,
Wonmi-Ku, Bucheon, 420-743, Korea

²Department of Microbiology, University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea

Received : April 26, 2006

Accepted : June 19, 2006

Coxsackievirus B3 (CVB3) is the nonenveloped virus containing a single-stranded positive-sense RNA as a genome. CVB3 infection can induce acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. CVB3 of icosahedral symmetry has four capsid proteins called VP1, VP2, VP3, and VP4. Although VP1 is a major antigenic determinant, VP2 is also an important protein for viral physiology, such as maturation cleavage and attenuation. However, VP2 study has been hampered, partly because VP2 antibody is not available. In this study, we developed peptide-based polyclonal VP2 antibody and analyzed its potency by Western blotting analysis and immunofluorescent assay. Purified B3-1 antibody (VP2 peptide antibody developed in here) showed the sensitivity and specificity, similar to VP1 monoclonal antibody which is commercially available. Moreover, this peptide antibody may be useful for double-staining with other antibodies derived from mouse. Therefore, the VP2 antibody may allow us to study CVB assembly and understand VP2 function in depth.

Key Words: Coxsackievirus B3, VP2, Peptide antibody

서 론

콕사키바이러스 B (Coxsackievirus B, CVB)의 혈청형은 6개가 있으며 (CVB1 - 6) 이들은 전형적인 human enteroviruses (Picornaviridae)에 속한다. 이 바이러스의 게놈은 단일가닥의 +RNA 구조를 가지고 있으며 약 7400 base 정도의 길이를 가지고 있다 (35). 바이러스 게놈은 icosahedral 구조를 가진 30 nm 길이의 캡시드 단백질에 의해 보호되어져 있으며, 게놈으로부터 하나의 polypeptide가 만들어진 후 바이러스 비구조 단백질인 2A와 3CD에 의해 잘려져서 완전한 바이러스를 형성하게 된다 (14,28). 캡시드 단백질은 네 개의

VP1, VP2, VP3, VP4인 polypeptide가 각각 약 60개 정도인 단백질로 구성되어 있다 (16,34). 일반적으로 CVB를 포함한 Picornaviridae에 속하는 바이러스들은 구조 단백질인 VP4, VP2, VP3, VP1이 5'UTR에서부터 순서대로 코딩되어 있으며 이 부분을 P1이라 부르고, 비구조 단백질들인 2A, 2B, 2C를 P2, 3A, 3B, 3C, 3D를 P3라 부른다. 특히 VP4와 VP2가 잘리기 전의 전구체를 VP0라 한다 (1,8,22,25).

Poliovirus를 포함한 이 과의 바이러스들은 일반적으로 바이러스 protease인 3C가 구조 단백질인 myristoylated capsid precursor (P1)를 잘라 protomer를 형성하게 되며 이 protomer는 VP0, VP3, VP1로 구성된 heterotrimer를 이루게 된다. 잘린 구조 단백질들은 바이러스 게놈이 없는 empty capsid 혹은 provirion을 형성하게 된다. 이 과정이 끝난 후 RNA가 삽입 (encapsidation) 되며 마지막 단계로 VP0가 VP4와 VP2로 나누어지게 된다. 이러한 과정을 성숙절단 (maturation clea-

*교신저자: 남재환. 420-743, 경기도 부천시 원미구 역곡2동 산 43-1, 가톨릭대학교 생명공학부 분자바이러스연구실
Phone: 02-2164-4852, Fax: 02-2164-4917,
e-mail: jhnam@catholic.ac.kr

vage)라 하며 일반적으로 이 부분의 절단은 autocatalytic 하게 잘리게 된다. 이러한 절단은 비리온의 안전성과 감염력에 매우 민감한 반응이기 때문에 만일 이 부분이 제대로 잘리지 않으면 감염력이 없는 돌연변이 바이러스가 만들어지게 된다 (3,7,12,17,23,29). 어떻게 이러한 성숙절단이 수행되는지에 대한 완전한 이해는 아직 되어 있지 않다. 단지 RNA encapsidation 때문에 궁극적으로 비리온이 안정화되며 감염력 있는 바이러스가 만들어 질것으로 생각 한다 (12,24). 일반적으로 poliovirus 및 CVB 모두에서 VP0의 절단 부위는 asparagine과 serine 아미노산 사이가 잘리는 것으로 알려져 있다 (5).

Poliovirus에서 immunodominant epitope II는 VP2 (aa 127~185)와 VP1 (aa 207~237)의 internal insertion 부위와 VP2의 carboxy terminus로 구성되어 있으며 (15,18,27), VP2의 항원 중화 부위 (antigenic neutralization)는 puff region 이라고 알려진 hypervariable region이며 이 부위는 바이러스 캡시드의 가장 바깥 부위에 주로 위치하여 캡시드가 형성하는 계곡 바닥의 가장자리를 형성하고 있다. CVB 역시 동일한 구조를 가진 것으로 추측되며 이 부분의 아미노산의 변화는 바이러스의 수용체로의 접근성에 영향을 미쳐 바이러스가 약독화 되는 원인을 제공 할 것으로 추정하고 있다 (3,18,23).

따라서 CVB의 VP2의 성숙절단이나 puff region을 연구하기 위해서는 VP2에 대한 항체를 가지고 있는 것이 VP2에 대한 immunoblot 실험이나 VP2에 결합하는 다른 factor들의 분석을 위한 immunoprecipitation (IP) test에 반드시 필요하다. 그러나 현재 상업적으로 구입이 가능한 관련 항체는 enterovirus VP1에 대한 단클론 항체 (NOVOCASTRA Laboratories Ltd. Newcastle, UK)만이 판매 되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 CVB를 포함한 Picornaviridae에 속하는 바이러스들의 VP2에 대한 연구에 필수적인 VP2에 대한 peptide 항체를 만들고자 하였으며 정제된 peptide 항체가 Western blot assay 및 immunofluorescent assay에 대해 유용한 지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

본 연구에 사용한 바이러스 중 CVB3는 H3주 (AAB02228)를 사용하였으며 이는 진은석 교수 (삼성병원 순환기 내과)로부터 분양 받았다. 나머지 바이러스들은 ATCC에서 구입하였으며 각각의 locus number는 다음과 같다; CVA9 (D00627), CVB1 (AAC00531), CVB2 (AF081485), CVB4 (X05690), CVB5 (X67706), CVB6 (AF039205), Echo6 (U16283), Echo7 (AAQ-73096), Echo9 (X84981), Echo30 (AAL37155). CVB1에서 CVB6

까지의 바이러스 배양 및 역가 확인은 자궁경부암세포주인 HeLa-UVM를 사용하였으며, Echo6, 7, 9, 30 및 CVA9은 원숭이 신장 유래의 Vero를 사용하였다. 두 세포주 모두 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Invitrogen-GIBCO, Rockville, MD, USA)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen-GIBCO, Rockville, MD, USA)을 첨가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 배양 하였다. 사용한 HeLa-UVM (본 논문에서는 HeLa 세포주로 명명)는 Sally Huber (University of Vermont, USA)로부터 입수하였으며 Vero는 ATCC에서 구입 하였다.

사용된 바이러스주는 90% 가량 자란 HeLa 혹은 Vero 세포에 10 multiplicity of infection (moi)로 감염 시켜 37°C에서 16시간 감염 시킨 후 3회에 걸쳐 freezing and thawing을 하여 세포 lysate 및 배양액을 함께 원심분리한 후 상층액을 분할하여 -80°C에 사용할 때까지 보관하였다. 보관된 바이러스 stock은 HeLa 및 Vero 세포주를 이용한 plaque assay를 실시하여 바이러스 역가를 결정하였다.

2. Peptide 제작

실험에 사용 할 VP2 부분의 peptide의 위치는 DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 프로그램을 이용하여 관련 CVB group 바이러스들의 배열 분석 및 항원성과 친수성이 높은 부위를 선정하였다. 또한 발현 후 다른 구조를 형성할 가능성이 있기 때문에 glycosylation site 및 myristoylation site 등 post-translation modification이 일어나지 않는 부위를 고려하였다. 제작된 peptide의 VP2에서의 위치는 아미노산 38에서 53까지이다. Peptide 제작은 (주)랩프런티어 (서울, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였다.

3. 동물 면역

SPF 상태로 사육된 토끼 2마리에 Fig. 2와 같은 스케줄 및 peptide 양을 이용하여 면역하였다. 토끼의 귀를 통해 정해진 시간에 채혈하였으며 마지막 채혈 시기에 심장 채혈을 하여 최대양의 혈액을 얻어 원심분리 후 혈청을 분주하여 -80°C에 보관 후 사용하였다.

4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

전체적인 ELISA 방법은 Chehadeh 등의 방법을 변형하여 사용하였다 (9). 간단히 방법을 서술하면 다음과 같다. 제작된 peptide를 B3-1 peptide라 명명하였으며 이를 96 well ELISA 용 플레이트에 well당 100 ng/well 씩 coating하였다. 면역 시킨 토끼로부터 얻은 혈청을 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/50000, 1/100000으로 희석하여 반응 시킨 후 rabbit IgG-HRP로 반응 시킨 후 발색하여 492 nm에서 측정하였다.

5. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 및 Western Blotting Analysis

Western blotting 분석의 전체적인 방법은 김 등 (21)의 방법을 이용하여 수행하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 사용한 바이러스들을 HeLa cell에 감염 시켜 cytopathic effect가 보이면 cell lysate를 M-PER (PIERCE, Rockford, IL, USA)을 사용하여 확보한 후 분주하여 -80°C 에 보관하여 Western blot용 항원으로 사용하였다. 이를 SDS-PAGE를 통해 전기영동을 100V에서 한 후 nitrocellulose로 옮겨 면역 된 토끼에서 확보한 혈청을 정제한 것을 1:1,000으로 희석하여 1차 항체로 사용하였다.

6. Immunofluorescent Assay (IFA)

IFA의 전체적인 방법은 김 등 (20)의 방법을 이용하여 수행하였다. HeLa 세포를 24-well plate에 coverslip (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA)을 덮고 3×10^4 개의 세포로 배양 한 후, 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 각각의 virus를 0.5 moi로 감염하여 16시간이 지난 후 차가운 고정액 [methanol : acetone (3:1)]으로 고정하고 PBS로 세척 후, 5% BSA-PBS에 정제된 B3-1 항체를 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 2차 항체는 goat-anti-rabbit FITC (Santa cruz, Santa cruz, CA, USA)를 사용하였다.

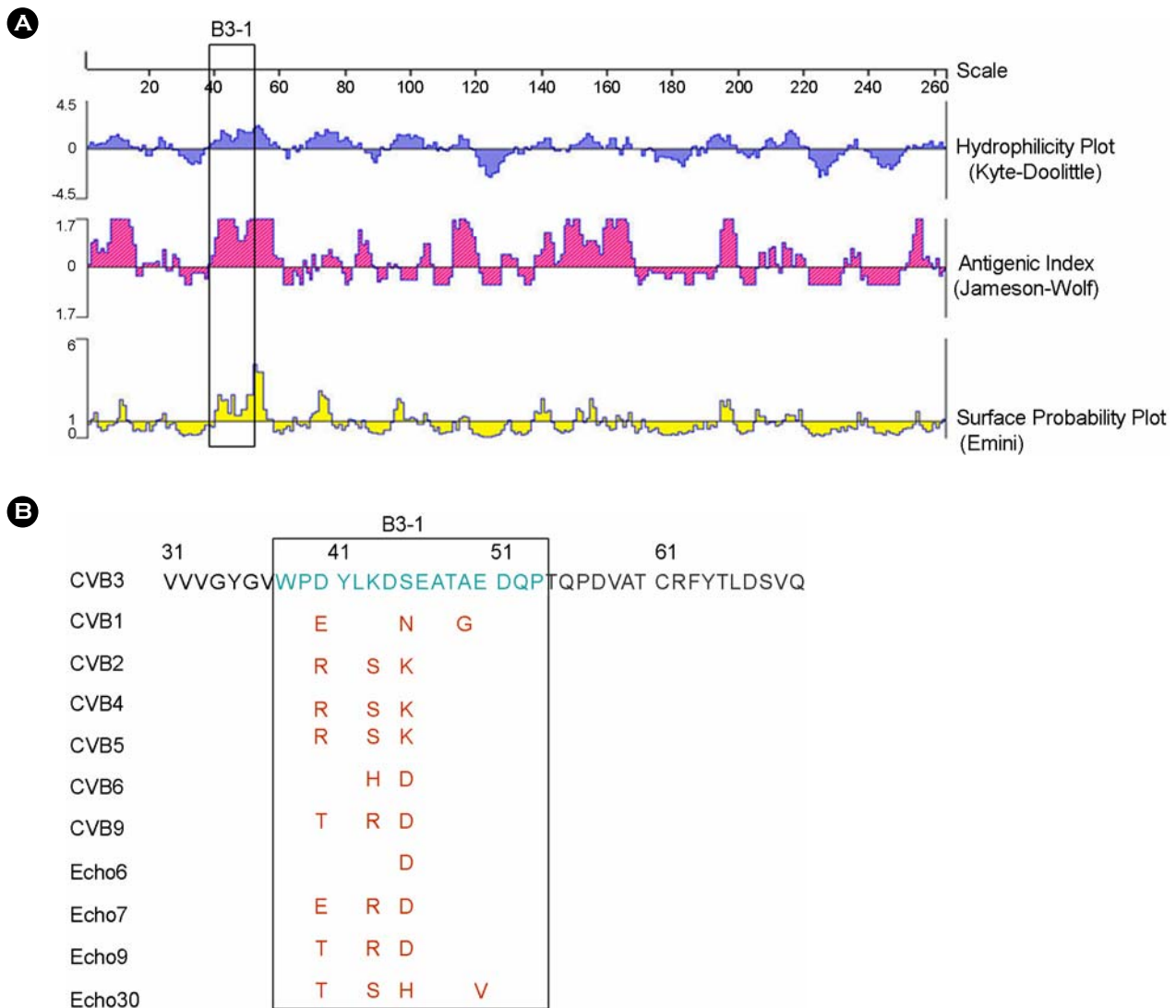


Figure 1. CVB3 VP2 region for peptide antibody. (A) Hydrophilicity plot, Antigenic index and Surface probability plot of CVB3 VP2. It derived by DNASTAR programme. (B) Alignment of amino acid sequence of various Enteroviruses, which is used for developing VP2 peptide antibody.

7. 항체 정제

면역된 토끼로부터 확보한 혈청에서 제작된 peptide인 B3-1 peptide에 대한 항체만을 정제하기 위해서 affinity purification 방법을 사용하였다. 간단히 방법을 설명하면 다음과 같다. B3-1 peptide와 resin을 coupling buffer와 함께 섞은 후 첫 번째 affinity gel을 만든다. 이 후 이 컬럼에 토끼로부터 확보한 혈청을 1 ml를 넣어 반응 시키고 난 후 elution buffer (0.1 M Glycine, pH 2.5 / 0.1M Citric acid, pH 3.0)를 사용하여 1 ml씩 6개를 받아 SDS-PAGE를 통해 정제된 정도를 확인하였다. 동일한 방법으로 protein A를 사용하여 한번 더 정제하였다. 마지막으로 $2 \times$ PBS buffer를 사용하여 투석 한 후 농축하여 1.0 mg/ml로 적정하여 -80°C 에 분주하여 보관한 후 사용하였다

결 과

1. CVB VP2에서 peptide 항체 제작에 사용 할 부분 선정

CVB3 H3주의 아미노산을 정렬하여 VP2 부분에서 항원성 (antigenic index)과 친수성 (hydrophilicity plot)이 높으며, 외부로 잘 들어난 부분 (surface probability plot)을 DNASTAR 프로그램 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)을 사용하여 선정하였다. 이러한 부분은 밖으로 노출될 확률이 높으며 따라서 항원으로서 작용 할 가능성이 높아 항체 생성이 잘 되는 부분이라고 생각되었다. 분석된 부분은 Fig. 1(A)에서 나

타내었다. 확인된 부분의 이름을 B3-1이라 명명하였으며 이 부분의 아미노산 염기서열을 다른 enterovirus group과 비교한 결과 완전히 일치하지는 않으나 많은 부분이 동일한 Fig. 1(B)과 같은 결과를 얻었다. 제작한 peptide의 아미노산 서열은 VP2의 38에서 53까지이며 마지막 C-terminal 부분에 cys를 붙인 것은 carrier protein에 conjugation 하기 위해 임의로 첨가한 아미노산이다. 이 부분에 대한 항체반응의 cross-reactivity는 Western blot과 IFA에서 확인하였다.

2. ELISA 결과

토끼에 B3-1 peptide를 면역 시킨 후 Fig. 2에서 표시한 시기별로 면역하고 확보된 토끼의 혈청을 이용하여 ELISA를 실시하였다. 면역 후 5, 7, 9주째 확보한 혈청을 이용하여 B3-1 peptide를 항원으로 하여 ELISA를 수행 한 결과, 면역 후 5주째에서 이미 ELISA 값이 의미 있게 증가하였다 (data not shown). Fig. 3에서는 면역된 두 마리의 토끼에서 확보한 9주째 혈청을 이용한 ELISA 결과를 보여 주고 있다. 두 마리의 토끼 혈청 모두에서 1/1000에서 1/100000으로 희석된 곳에서 pre-immune serum 보다 높은 수치를 보이고 있었다 (Fig. 3).

3. B3-1 peptide에 대한 항체 정제

제작된 peptide를 이용하여 면역한 토끼 중 1번 토끼의 혈청 안에 있는 B3-1 peptide에 대한 항체만을 affinity 컬럼을 이용하여 정제하였다. 처음에는 B3-1 peptide를 이용하여

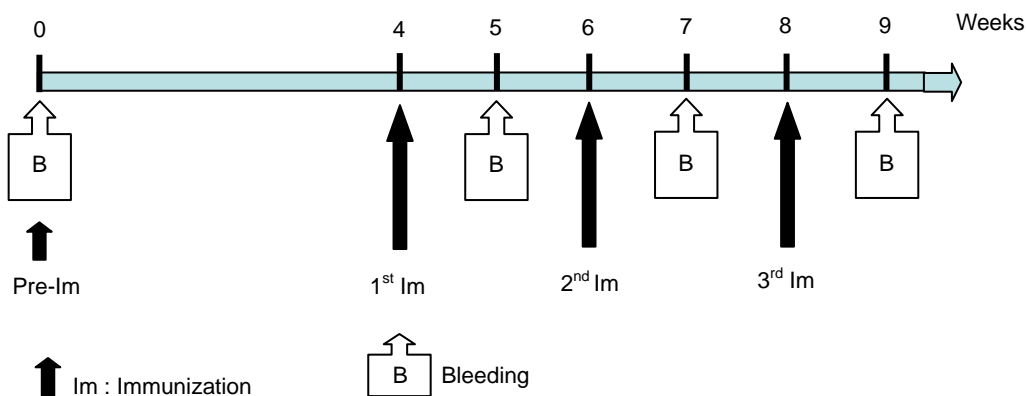


Figure 2. Immunization schedule for developing CVB VP2 peptide antibody.

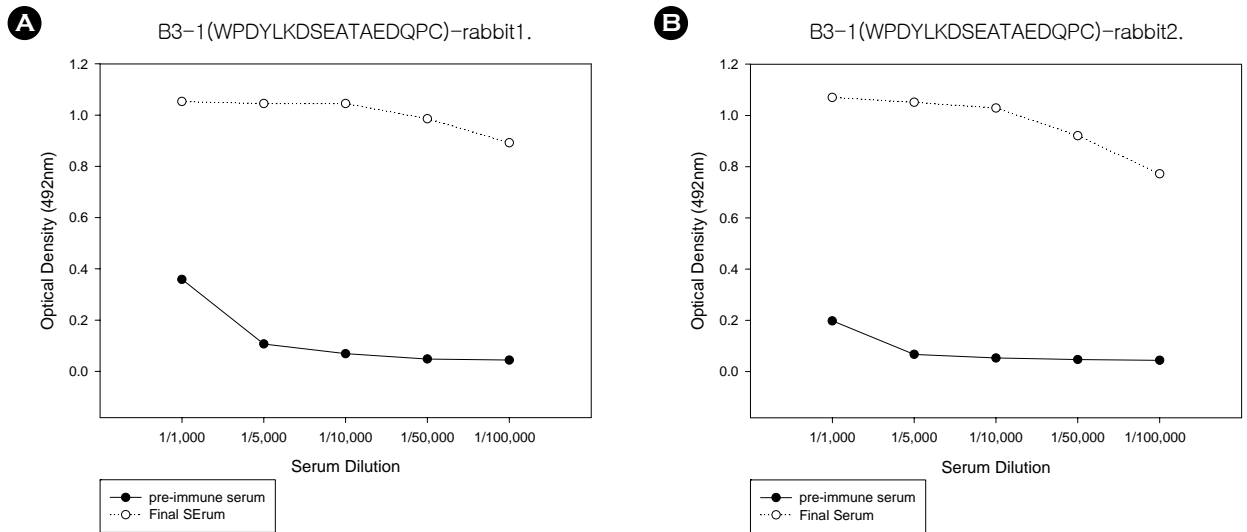


Figure 3. ELISA results from rabbit 1 (A) and rabbit 2 (B). B3-1 peptide was used as antigen and week 9 serum derived from two rabbits immunized with B3-1 peptide immunization were used as primary antibodies.

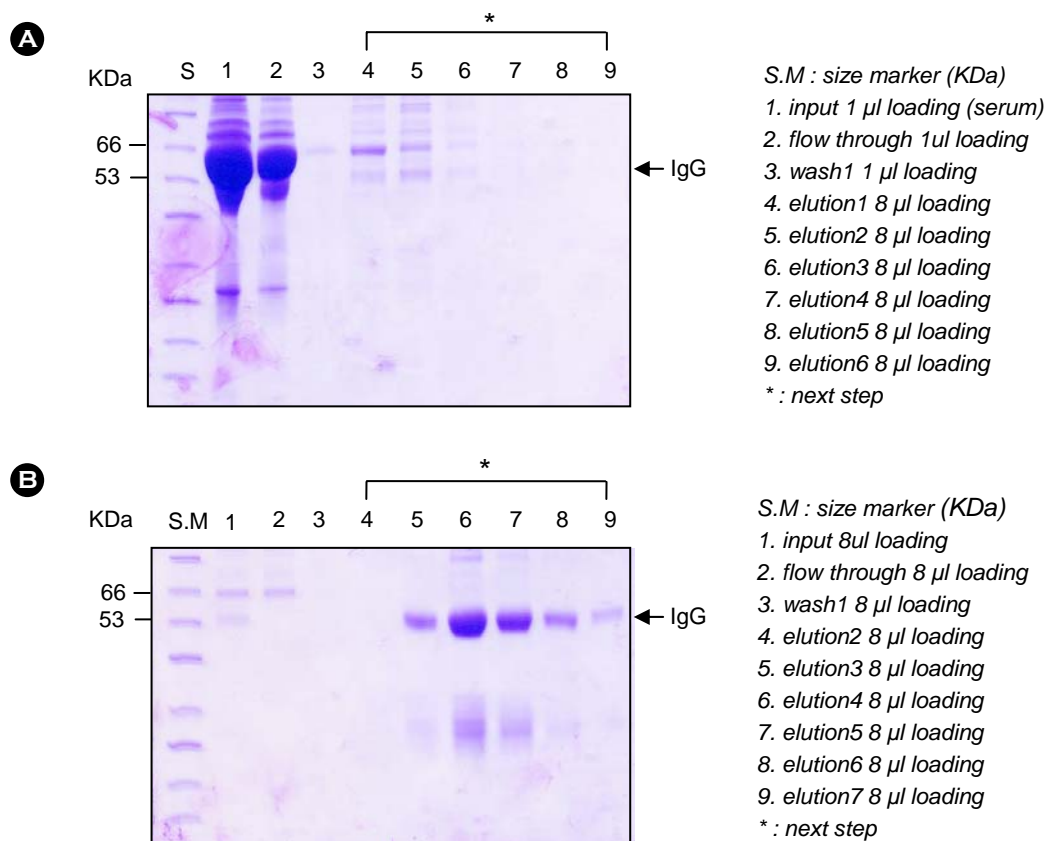


Figure 4. SDS-PAGE results of purified B3-1 peptide antibody. (A) The primary step is done by processing antigen specific affinity purification. (B) The second step is done by Protein A purification.

정제한 후 다시 protein A를 이용하여 정제하였으며 각각의 컬럼 정제에서 확보한 elution 용액 1 ml 중 각각 8 μ l 씩을

SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다 (Fig. 4). Fig. 4에서 보여 주는 것처럼 protein A 컬럼에서 추출 한 용액 중 4번째와 5

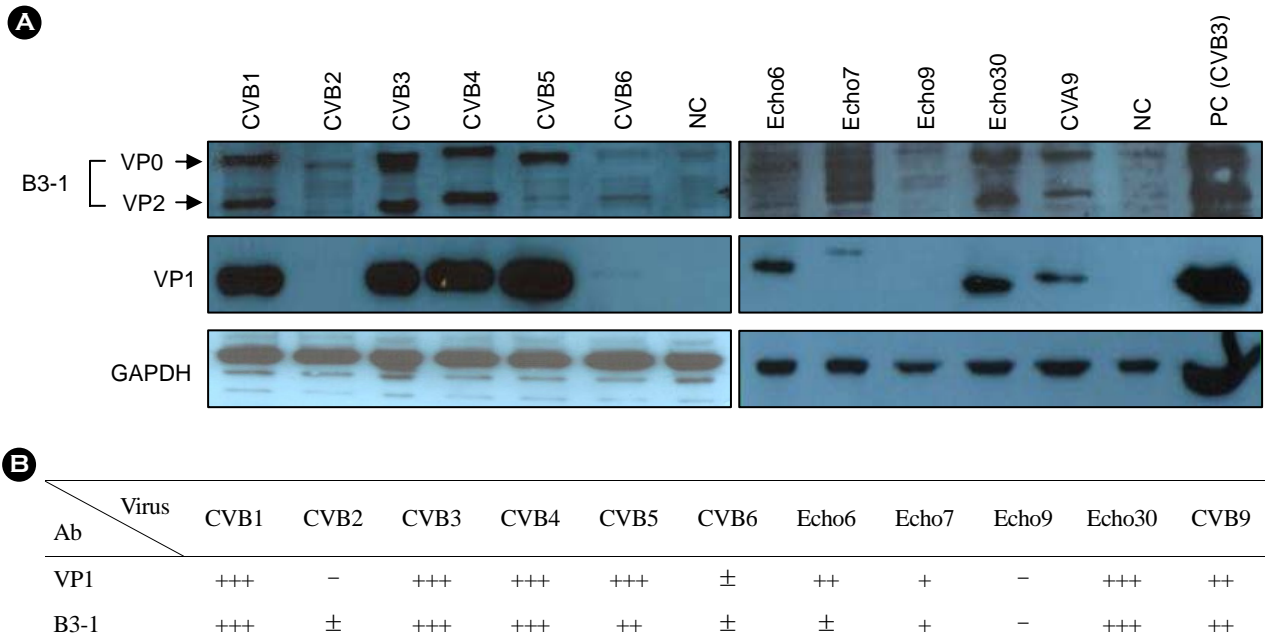


Figure 5. Comparison of Western blotting results. **(A)** Various enteroviruses-infected cell lysates are used as antigen for Western blot and purified B3-1 peptide antibody was used as primary antibody. **(B)** Summary table for Western blot data.

번째에서 받은 용액에 대부분의 항체가 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

4. Enterovirus에 대한 B3-1 항체의 cross-reactivity

본 연구에서 제작된 CVB3 VP2 부분에 대한 B3-1 peptide 항체가 다른 enterovirus를 확인 할 수 있는지를 Western blot과 IFA 방법을 이용하여 조사하였다. CVB1에서 CVB6까지의 모든 coxsackievirus들과 Echo6, 7, 9, 30, 그리고 coxsackievirus A9을 HeLa cell 및 Vero cell에 감염 시켜 well 당 total protein을 10 µg 넣어 항원으로 사용하였다. 정제된 B3-1 항체는 1:1,000으로 희석하여 Western blot 일차 항체로 사용하였다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼 B3-1 항체는 CVB1, CVB3, CVB4, CVB5, Echo30, CVA9에서 VP2 부분에 대한 밴드와 더불어, 흥미롭게도 VP0에 대한 밴드 역시 보여주고 있다. 그러나 CVB5에서는 VP2 부분에 대한 밴드는 보이지 않고 VP0에 대한 밴드만을 보여주고 있다. Echo7은 background가 심하기는 하나 VP2와 VP0 밴드가 보이고 있다. 나머지 바이러스들에서는 원하는 위치에 약한 밴드가 잡히거나 불분명한 밴드가 보이고 있다. 또한 이미 상업적으로 판매되고 있는 VP1에 대한 단클론 항체를 1:2,000으로 희석하여 동일한 바이러스 항원들에 대해 조사하여 B3-1 항체의 결과와 비교하면, Fig. 5에서 볼 수 있는 것과 같이 민감도 (sensitivity) 및 특이도 (specificity)가 거의 유사하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용한 B3-1 항체가 VP1 단클론 항

체와 유사한 정도로 바이러스 항원을 검출 할 수 있음을 보여 주고 있다.

B3-1 peptide 항체를 IFA에 사용 할 수 있는지를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. IFA를 위해 정제된 B3-1 항체는 1:100으로 희석하여 사용하였다. Fig. 6에서 볼 수 있는 것처럼 B3-1 항체는 CVB1, CVB3, CVB4, CVB5 및 Echo30, CVA9에 대해서는 양성 반응을 보여주는 등 Western Blot에서 얻어진 결과와 유사한 검출 능력을 보여주고 있다.

이러한 결과들은 본 연구에서 만들어진 peptide 항체인 B3-1이 CVB를 포함한 다양한 enterovirus를 검출 하고 연구하는데 사용 될 수 있음을 의미하고 있다.

고 찰

Coxsackievirus는 전술한 바와 같이 enterovirus에 속하는 Picornaviridae의 바이러스이다 (35). 이 바이러스 과에 대한 연구는 poliovirus를 중심으로 수십 년간 지속적으로 연구되어져 왔다. 현재는 coxsackievirus를 포함한 다양한 enterovirus에 대한 개별적인 연구를 통해 유사점과 차이점 등이 확인되어지고 있다. 또한 coxsackievirus는 사람에게 감염되어 심근염 (myocarditis), 확장성 심근증 (dilated cardiomyopathy, DCM) 등 심장질환과 더불어, 당뇨병, 간염, 췌장염, 무균성 수막염 등을 유발하는 것이 확인되어졌다 (2,6,11,19,26,33). 이러한 coxsackievirus가 유발하는 질환 중 DCM은 북미대륙

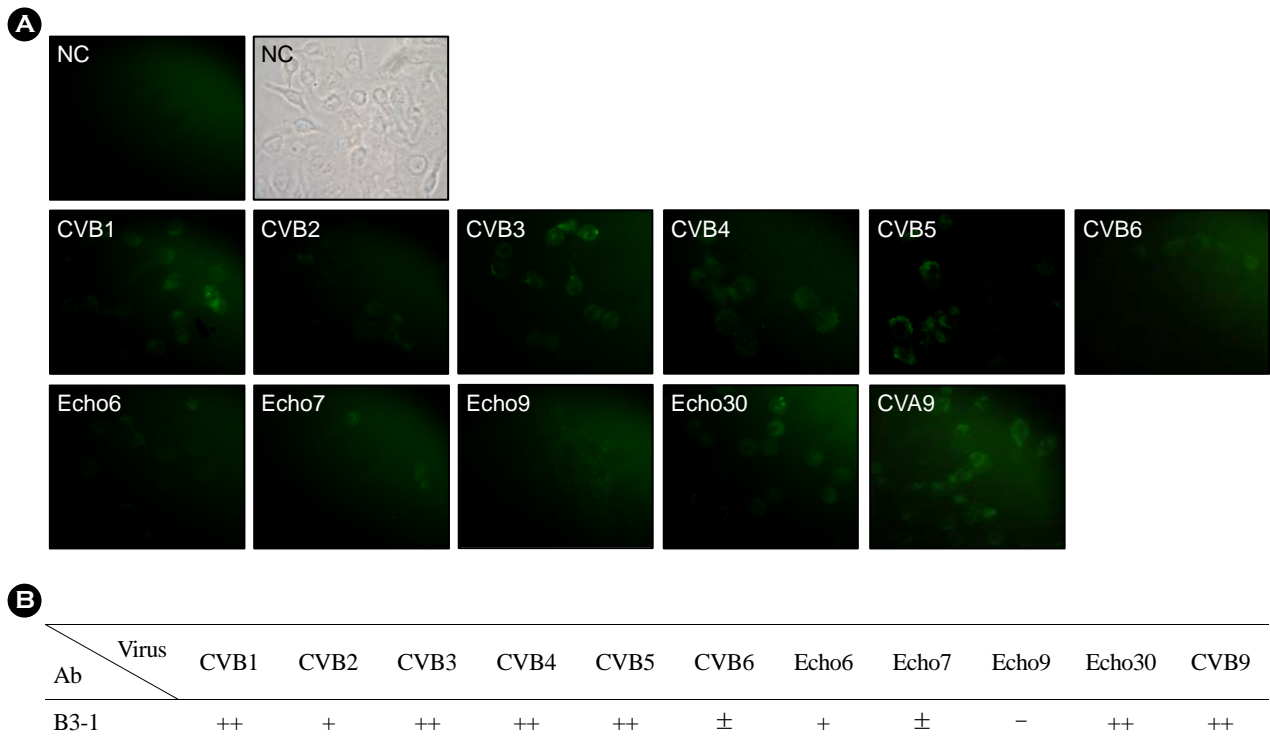


Figure 6. Comparison of Immunofluorescent assay (IFA) results. **(A)** Various enteroviruses-infected cells cultured on cover slip are used as antigen for IFA and purified B3-1 peptide antibody was used as primary antibody. **(B)** Summary table for IFA data. NC indicates negative control which means non-infected cells.

에서 100,000명당 6 case가 발견되며 매년 100,000명의 신규 환자가 발생하고 있고, 심장 이식의 원인 중 50%를 차지하고 있다 (10). 이러한 관점에서 최근 coxsackievirus에 대한 연구가 점차적으로 증가하는 추세에 있다.

바이러스 캡시드 단백질 중 VP1, 2, 3가 외부에 노출되는 loop를 형성하게 되며, 이 부분의 아미노산의 변이가 다양한 바이러스 변이주의 원인이 된다. 특히 VP1과 VP2의 주요 외부 loop인 DE와 EF loop 및 VP3의 knob region이 바이러스 중화 항체 생성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다 (4,13,30).

바이러스 결합 (assembly) 및 바이러스 단백질의 절단 (cleavage), 감염 후 세포 내에서의 위치, 바이러스 단백질들의 감염된 세포 내에서의 기능 등에 대한 연구를 수행할 때 문제가 되는 것은 바이러스 단백질에 대한 항체가 다양하지 못한 것이 가장 큰 연구의 걸림돌이 되고 있다. 현재 enterovirus 연구에서 상업적으로 이용 가능한 항체는 NOVOCASTRA에서 판매하는 CVB5 VP1에 대한 단클론 항체 (NCL-enterovirus VP1)가 유일하다. 그러나 이 항체는 마우스 유래이기 때문에 다른 세포 단백질과의 상관관계 연구를 위해 confocal microscopy를 사용하여 이중염색을 수행하는 경우 문제가 발생하고 있다. 왜냐하면 많은 세포 내 요소

의 항체들이 마우스에서 유래한 경우가 많기 때문에 같은 마우스 유래인 VP1 항체와의 이중염색에 어려움이 있다. 이미 Coxsackievirus의 마지막 assembly 단계에서 VP0에서 자동적으로 VP4와 VP2가 잘리지 않으면 감염력 있는 바이러스가 만들어지지 않는다는 연구가 발표되었다 (3,7,9,12,17,32). 또한 성숙한 바이러스에서 VP4가 없으면 비감염성인 A particle이 만들어진다고 알려져 있다 (31). 그러나 이러한 연구를 위해서 반드시 필요한 것은 마우스 유래가 아닌 VP4, VP2, VP3에 대한 항체이다. 본 연구에서는 이를 위해 우선 VP2에 대한 토끼 유래 peptide 항체를 만들어 그 유용성을 확인하였다.

Fig. 5와 6에서 볼 수 있는 것처럼 본 연구에서 만들어진 CVB3 H3의 VP2에 대한 peptide 항체는 최초 만들어진 CVB3 H3주에 대해서 충분한 검출 효율을 보여주고 있다. 뿐만 아니라 같은 coxsackievirus group인 CVB1, CVB4, CVB5, CVA9 및 다른 enterovirus group인 Echo7, Echo30 등에서도 충분한 검출 능력을 보여주고 있다. 이외에도 다른 enterovirus에도 background가 강하거나 원하는 밴드나 시그널이 약하지만 어느 정도의 검출 효율을 보여주고 있다. 이러한 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specificity)는 이미 상업적으로 이용되고 있는 VP1에 대한 단클론 항체와 유사하다고 할 수

있다. Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼 이들의 아미노산 서열은 완전히 일치하지는 않는다. 이는 아마도 아미노산 서열의 완전한 일치성과는 상관없이 이 부분의 conformation에 의해 항체의 인식 정도가 유사하거나 혹은 전혀 구조적으로 맞지 않는 것이 원인일 것으로 추정된다. 또한 본 연구에서 제작된 peptide 항체인 B3-1 항체는 coxsackievirus의 VP0와 VP2를 정확히 구분하여 확인 할 수 있기 때문에 앞으로 coxsackievirus의 maturation step에 대한 연구에 이용 될 수 있을 것이다.

본 연구를 통해 coxsackievirus 단백질에 대한 peptide 항체가 Western blot 및 IFA에서 충분한 효능을 발휘하고 있음을 알 수 있으며 따라서 향후 유사한 방법으로 coxsackievirus VP4 및 VP3, VP1에 대한 항체를 제작하여 바이러스의 assembly 연구 및 각 바이러스 단백질이 연관 관계를 맺는 감염된 세포 내의 세포 단백질 연구 (바이러스 단백질의 기능 연구) 등에 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 가톨릭대학교 교비연구비 지원 및 한국과학재단 특장기초연구 (R01-2005-000-10668-0)의 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1) 전은석: 심근염과 심근증의 원인. 순환기 **23(부록)**: 208-216, 1993.
- 2) 전은석: 바이러스 심근염과 심근증의 병인기전. 생화학 뉴스 **22(1)**: 36-44, 2002.
- 3) Ansardi D, Morrow C: Amino acid substitutions in the poliovirus maturation cleavage site affect assembly and result in accumulation of provirin. *J Virol* **69**: 1540-1547, 1995.
- 4) Appleyard G, Russell SM, Clarke BE, Speller SA, Trowbridge M, Vadolas J: Neutralization epitopes of human rhinovirus type 2. *J Gen Virol* **71**: 1275-1282, 1990.
- 5) Arnold E, Luo M, Vriend G, Rossmann MG, Palmenberg aCV, Parks GD, Nicklin MJ, Wimmer E: Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 21-25, 1987.
- 6) Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ: Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **223**: 31-52, 1997.
- 7) Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM: Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9Å resolution. *Protein Sci* **3**: 1651-1669, 1994.
- 8) Carpernter CM, Boak RA: Coxsackie viruses; a review of pathologic, epidemiologic, diagnostic and etiologic observations. *Calif Med* **77(2)**: 127-130, 1952.
- 9) Chehadeh W, Lobert PE, Sauter P, Goffard A, Lucas B, Weill J, Vantighem MC, Alm G, Pigny P, Hober D: Viral protein VP4 is a target of human antibodies enhancing coxsackievirus B4-and B3-induced synthesis of alpha interferon. *J Virol* **79(22)**: 13882-13891, 2005.
- 10) Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ III: Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation* **80**: 564-572, 1989.
- 11) D'Alessio DJ: A case-control study of group B Coxsackievirus immunoglobulin M antibody prevalence and HLA-DR antigens in newly diagnosed cases of insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* **135**: 1331-1338, 1992.
- 12) Curry S, Fry E, Blakemore W, Abu Ghazaleh R, Jackson T, King A, Lea S, Newman J, Stuart D: Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **71**: 9743-9752, 1997.
- 13) Dan M, Chantler JK: A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection. *J Virol* **79(14)**: 9285-9295, 2005.
- 14) Fernandez-Tomas C, Baltimore D: Morphogenesis of poliovirus. II. Demonstration of a new intermediate, the provirin. *J Virol* **12**: 1122-1130, 1973.
- 15) Haarmann CM, Schwimmbeck PL, Mertens T, Schultheiss HP, Strauer BE: Identification of serotype-specific and nonserotype-specific B-cell epitopes of coxsackie B virus using synthetic peptides. *Virology* **200**: 381-389, 1994.
- 16) Harrison SC: Virus structures and conformational rearrangements. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 157-164, 1995.
- 17) Hindiyyeh M, Li QH, Basavappa R, Hogle JM, Chow M: Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol* **73(11)**: 9072-9079, 1999.
- 18) Hogle JM, Chow M, Filman DJ: Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9Å resolution. *Science* **229**: 1358-1365, 1985.
- 19) Kaplan MH, Klein SW, McPhee J, Harper RG: Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: A serious childhood illness. *Rev Infect Dis* **5**: 1019

- 1032, 1983.
- 20) **Kim JY, Jeon ES, Lim BK, Kim SM, Chung SK, Kim JM, Park SI, Jo I, Nam JH:** Immunogenicity of a DNA vaccine for coxsackievirus B3 in mice: protective effects of capsid proteins against viral challenge. *Vaccine* **23(14)**: 1672-1679, 2005.
 - 21) **Kim SM, Park JH, Chung SK, Kim JY, Hwang HY, Chung KC, Jo I, Park SI, Nam JH:** Coxsackievirus B3 infection induces cyr61 activation via JNK to mediate cell death. *J Virol* **78**: 13479-13488, 2004.
 - 22) **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emimi EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E:** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**: 547-553, 1981.
 - 23) **Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S:** A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* **70(11)**: 7811-7818, 1996.
 - 24) **Lee WM, Monroe SS, Rueckert RR:** Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectious. *J Virol* **67**: 2110-2122, 1993.
 - 25) **McLean DM:** Coxsackieviruses and echoviruses. *Am J Med Sci.* **251(3)**: 351-368, 1966.
 - 26) **Melnick JL, Hampil B:** WHO collaborative studies on enterovirus reference antisera: Fourth report. *Bull World Health Organ* **48**: 381-396, 1973.
 - 27) **Minor PD, Ferguson M, Evans DM, Almond JW, Icenogle JP:** Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* **67**: 1283-1291, 1986.
 - 28) **Molla A, Harris KS, Paul AV, Shin SH, Mugavero J, Wimmer E:** Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem* **269**: 27015-27020, 1994.
 - 29) **Moscufio N, Yafal AG, Rogove A, Hogle J, Chow M:** A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* **67**: 5075-5078, 1993.
 - 30) **Muckelbauer JK, Rossmann MG:** The structure of coxsackievirus B3. *Curr Top Microbiol Immunol* **223**: 191-208, 1997.
 - 31) **Racaniello VR, Baltimore D:** Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4887-4891, 1981.
 - 32) **Rebel JM, Leendertse CH, Dekker A, Moormann RJ:** Effects of mutations in the VP2/VP4 cleavage site of Swine vesicular disease virus on RNA encapsidation and viral infectivity. *Arch Virol* **148**: 1747-1756, 2003.
 - 33) **Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, Hayden FG:** Enterovirus meningitis in adults. *Clin Infect Dis* **27**: 896-898, 1998.
 - 34) **Rossmann MG, Johnson JE:** Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**: 533-573, 1998.
 - 35) **Woodruff JF:** Viral myocarditis: A review. *Am J Pathol* **101**: 424, 1980.