



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수 산 학 박 사 학 위 논 문

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)  
로부터 항균 단백질 유전자 *hamp*,  
*leap2* 및 *wap65*의 분리 및 발현 특징  
분석



2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

이 상 윤

수 산 학 박 사 학 위 논 문

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)  
로부터 항균 단백질 유전자 *hamp*,  
*leap2* 및 *wap65*의 분리 및 발현 특징  
분석

지도교수 남 윤 권

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

이 상 윤

이상윤의 수산학박사 학위논문을  
인준함.

2015년 2월 25일



# 목 차

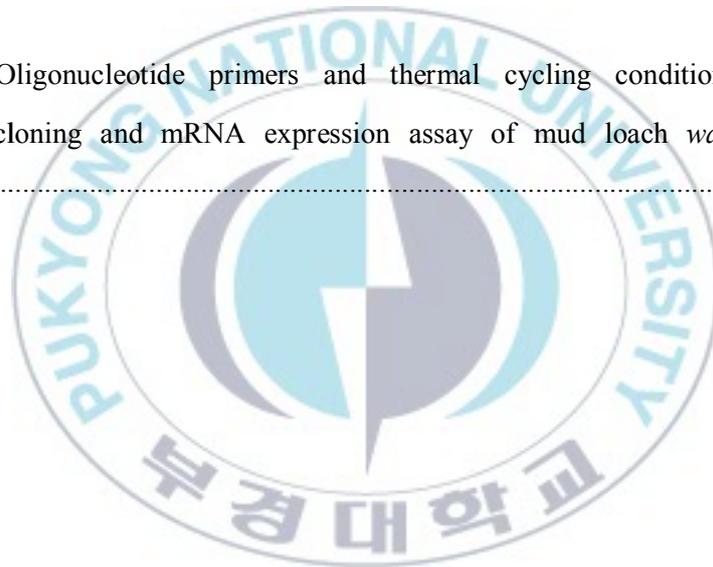
목차 (Content) .....	i
표 목차 (List of Tables) .....	iii
그림 목차 (List of Figures) .....	iv
영문 요약 (Abstract) .....	ix
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
2.1. 항균 단백질 유전자들의 transcripts 탐색 및 클로닝 .....	6
2.2. Genomic 유전자 및 5'-flanking 영역의 클로닝 .....	9
2.3. 기초 전사 발현 분석 .....	12
2.4. 다양한 실험 자극에 따른 발현 분석 .....	13
2.5. mRNA 정량 PCR 분석 및 통계처리 .....	17
2.6. 생물정보학 분석 .....	17
III. 결과 .....	19
3.1. 항균 단백질 유전자들의 cDNA 및 아미노산 서열 특징 .....	19
3.2. Genomic 유전자 구조 및 프로모터 영역의 특징 .....	29

3.3. 항균 단백질 유전자 mRNA의 성체 조직 내 발현 분포 양상 .....	43
3.4. 발생단계별 항균 단백질 유전자의 발현 양상 .....	46
3.5. 실험자극에 대한 전사발현 특징 .....	50
IV. 고찰 .....	74
감사의 글 .....	87
참고문헌 .....	89



## 표 목차(List of Tables)

Table 1. Primers used for isolation, blot analysis and mRNA expression assay of mud loach <i>hamp</i> gene .....	7
Table 2. Oligonucleotide primers and thermal cycling conditions used for molecular cloning and mRNA expression assay of mud loach <i>leap2</i> gene .....	8
Table 3. Oligonucleotide primers and thermal cycling conditions used for molecular cloning and mRNA expression assay of mud loach <i>wap65</i> isoform genes .....	10



## 그림 목차(List of Figures)

Fig. 1. Multiple sequence alignment of mature mud loach HAMP peptide along with teleostean orthologues .....	21
Fig. 2. Multiple alignments of mud loach LEAP2 mature peptides along with representative teleosean and mammalian species .....	22
Fig. 3. Predicted 3D model structures of mud loach LEAP2 isoforms .....	24
Fig. 4. Pairwise alignment of mud loach WAP65-1 and WAP65-2 amino acid sequences .....	25
Fig. 5. Partial multiple sequence alignment with teleost WAP65 orthologues and human hemopexin (HPX) .....	27
Fig. 6. Tripartite organization of mud loach <i>hamp</i> gene .....	30
Fig. 7. PCR-RFLP strategy to perform allelic genotyping of mud loach <i>hamp</i> gene .....	31
Fig. 8. PCR-RFLP genotyping of <i>hamp</i> alleles with 18 unrelated mud loach individuals .....	32
Fig. 9. Mendelian transmission of <i>hamp</i> alleles from parents to progeny as	

confirmed in three independent crosses .....	34
Fig. 10. Genomic Southern blot hybridization analysis of mud loach <i>hamp</i> gene .....	35
Fig. 11. Transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach <i>hamp</i> gene .....	36
Fig. 12. Gene structure of mud loach <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> genes .....	38
Fig. 13. Comparison of transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> genes .....	39
Fig. 14. Gene structure of mud loach <i>wap65-1</i> and <i>wap65-2</i> genes .....	41
Fig. 15. Comparison of transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach <i>wap65-1</i> , <i>wap65-2</i> genes and human <i>HPX</i> gene .....	42
Fig. 16. Tissue distribution and basal expression level of mud loach <i>hamp</i> transcripts, as judged by real-time RT-PCR assay .....	44
Fig. 17. Tissue expression of mud loach <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> genes .....	45
Fig. 18. Distribution of mud loach <i>wap65-1</i> transcripts in adult tissues .....	47

Fig. 19. Distribution of mud loach <i>wap65-2</i> transcripts in adult tissues .....	48
Fig. 20. Quantitative expression profile of mud loach <i>hamp</i> , <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> genes at different early developmental stages .....	49
Fig. 21. Representative RT-PCR gels to show the mRNA expression of mud loach <i>wap65-1</i> and <i>wap65-2</i> isoforms along with an 18S rRNA control during embryonic development .....	51
Fig. 22. Differential expression of mud loach <i>hamp</i> gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay .....	52
Fig. 23. Differential expression of mud loach <i>hamp</i> gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay .....	53
Fig. 24. Differential expression of mud loach <i>hamp</i> gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay .....	55
Fig. 25. Partial nucleotide sequence of mud loach interleukin-1 beta (IL-1b) cDNA .....	56
Fig. 26. Differential modulation of mud loach <i>hamp</i> expression in responsive to iron overload as assessed by real-time RT-PCR .....	57
Fig. 27. Differential modulation of mud loach <i>hamp</i> expression in responsive	

to copper exposure .....	58
Fig. 28. Quantitative RT-PCR for <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> expression in response to LPS .....	60
Fig. 29. Quantitative RT-PCR for <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> expression in response to polyI:C .....	61
Fig. 30. The relative expression of <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> in mud loach after intraperitoneal injection with <i>E. tarda</i> .....	62
Fig. 31. Differential expression of mud loach <i>leap2a</i> gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay .....	64
Fig. 32. Differential expression of mud loach <i>leap2b</i> gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay .....	65
Fig. 33. Differential modulation of <i>leap2</i> isoforms expression in responsive to heavy metal exposures .....	67
Fig. 34. Quantitative analysis of the mud loach <i>leap2a</i> and <i>leap2b</i> genes expression during iron overload .....	68
Fig. 35. Altered hepatic mRNA levels of mud loach <i>wap65</i> isoforms in response to thermal change .....	70

Fig. 36. Differential modulation of mud loach *wap65* isoforms by lipopolysaccharide (LPS) injection ..... 71

Fig. 37. Differential modulation of mud loach *wap65* isoforms by *E. tarda* challenge ..... 72

Fig. 38. Differential expression of mud loach *wap65* isoforms in response to experimental exposure to cadmium (Cd), copper (Cu) and nickel (Ni) by immersion ..... 73



**Molecular characterization and expression analysis of *hamp*, *leap2* and *wap65*  
antimicrobial genes from mud loach (*Misgurnus mizolepis*)**

Lee Sang Yoon

Department of Fisheries Biology, The Graduate School  
Pukyong National University

**Abstract**

In teleosts, the innate immunity is a pivotal protective system against invading pathogens and the antimicrobial proteins including antimicrobial peptide and iron sequestering protein play the crucial roles in the first defense line of the innate system. To get a deeper insight into the coordinated cross-talks between liver-expressed antimicrobial proteins in the mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes), this study was aimed to isolate and characterize the genetic determinants of three antimicrobial proteins, hepcidin (HAMP), liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) and warm-temperature acclimation associated 65-kDa protein (WAP65), and scrutinize their basal and stimulated mRNA expression patterns in response to various experimental immune challenges.

The gene encoding hepcidin, an antimicrobial peptide, was isolated and characterized in the mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes). Mud loach hepcidin shows a considerable degree of structural homology to other vertebrate *hamp* orthologues at both the gene and protein levels, particularly with respect to its tripartite genomic organization, typical transcription factor binding motifs in its promoter and conserved cysteine residues in the mature cationic peptide. The mud loach possesses at least two allelic forms of *hamp*, which are expected to be translated into the same hepcidin preproprotein. The two alleles are transmitted from parental fish

to offspring with a Mendelian inheritance pattern, as demonstrated with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) genotyping. Southern blot hybridization analysis showed a high degree of polymorphisms in the restriction patterns of individuals.

Full-length cDNAs of *leap2* isoform genes (*leap2a* and *leap2b*) were cloned from mud loach. Both mud loach *leap2* isoform genes displayed a three-exon structure that is common to most teleostean *leap2* genes. Several consensus binding sites for transcription factors including C/EBP, HNF, HIF-1, MRE, AP-1, NF-AT, IL6-REBP, USF, Ahr, and/or STAT were found in their 5' regions. Both LEAP2 mature peptides consisted of 41 amino acid residues and represented four cysteines at the conserved positions to form two disulfide bonds, which is also common to other teleostean LEAP2 orthologues.

Genomic organizations including the structural characteristics of 5' and/or STAT regions of two warm-temperature-acclimation-associated 65 kDa protein (*wap65-1* and *wap65-2*) isoform genes were characterized. Both mud loach *wap65* isoform genes displayed a ten-exon structure that is common to most teleostean *wap65* genes. The two mud loach *wap65* isoforms were predicted to possess various stress/immune-related transcription factor binding sites in their regulatory regions; however the predicted motif profiles were different between the two isoforms, in which the inflammation-related transcription factor binding motifs such as NF- $\kappa$ B and CREBP sites are more highlighted in the *wap65-2* isoform than in *wap65-1* isoform. The deduced amino acid sequences of the two mud loach WAP65 isoforms (WAP65-1 and WAP65-2) share moderate levels of sequence homology with their corresponding orthologues from teleosts and with human hemopexin, a possible mammalian homologue. Both isoforms display conserved features, including essential motifs and/or residues that are important for the protein structure of hemopexin. In overall, WAP65-2 is more homologous to human hemopexin than is WAP65-1.

From various gene expression analyses, mud loach *hamp* mRNA is

predominantly expressed in the liver under basal, non-stimulated conditions, although many other tissues showed detectable levels of *hamp* transcripts in RT-PCR assay. *Hamp* transcripts were developmentally regulated where mRNA expression level of *hamp* was sharply elevated at post-gastrulation stage, decreased at 3-4 somites stage and rebounded at hatched larvae. Lipopolysaccharide (LPS) and bacterial challenges induced significantly *hamp* expression, whereas *hamp* was not clearly stimulated by polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] injection. Iron overload and Cu exposure also elevated *hamp* transcripts in various tissues, suggesting that *hamp* is associated with various cellular pathways involved in host defense mechanism. The transcriptional activation of mud loach *hamp* in response to these stimuli varied among tissue types, and the liver appears predominantly involved in hepcidin-mediated iron regulation. However, hepcidin expression in the kidney and spleen was preferentially modulated by inflammation-mediated signals produced by immune challenges. Our results suggest that mud loach hepcidin has two basic functions, in iron regulation and antimicrobial activity, and that its transcription is also modulated by other environmental perturbations, including heavy metal exposure.

Expression assays revealed that *leap2* gene reveals an isoform-specific tissue distribution pattern in which *leap2a* mRNAs were expressed in a wide range of mud loach tissues including liver, ovary, intestine, skin, muscle, testis and kidney, while *leap2b* mRNAs were largely predominant in the liver. The onset mRNA expressions of *leap2a* and *leap2b* during development were different from each other and varied depending upon embryonic and larval development stages. *Leap2a* and *leap2b* mRNA transcripts were differentially modulated by various stimuli, including immune challenge (LPS, polyI:C or bacterial injection), iron overload and heavy metal exposure (cadmium, chromium, copper, iron, manganese, nickel or zinc). *Leap2a* and *leap2b* displayed up- and down-regulated expression patterns in response to various stimuli and the modulation patterns were also apparently variable among tissues.

Both mud loach *wap65* transcripts are predominantly expressed in liver,

although the transcripts are ubiquitously detectable in most tissues with variable basal expression levels. Both *wap65* isoforms are also differentially regulated during embryonic development, and the changes in transcript levels during embryogenesis are greater for *wap65-2* than for *wap65-1*. The transcription of the *wap65-1* genes is differentially modulated by various stimuli, including thermal changes, immune challenge (lipopolysaccharide injection or bacterial infection), and heavy metal exposure (cadmium, copper, or nickel). The isoform *wap65-1* is more responsive to warm temperature treatments than *wap65-2*, whereas *wap65-2* is much more strongly stimulated by immune and heavy metal challenges than is *wap65-1*. Taken together, the results of this study suggest that mud loach WAP65 isoforms are potentially involved in multiple cellular pathways and that the two mud loach *wap65* isoforms undergo functional partitioning or subfunctionalization.

Taken together, the three liver-expressed antimicrobial proteins characterized in this study turned out to play important roles in mud loach innate immunity particularly during acute phase of bacterial invasion. Of the three proteins, HAMP might be the central component for the cross talks between iron regulation and bactericidal action. LEAP2 might display supportive roles for HAMP action, while WAP65-2 would be closely associated with the iron sequestration defense mechanism in the innate immunity. Data from this study could be a useful and fundamental basis for future strategy to perform molecular genetic breeding for the development of bacterial disease-resistant fish models.

# I. 서론

선천성 면역체계는 척추동물에 있어 1차 생체 방어체계로서 세포 및 체액성 반응으로 구성된 복합적인 시스템이다(Ausubel 2005, Aoki et al., 2008). 척추동물 가운데 최하위 분류군에 속하는 경골어류는 포유류 등 고등 척추동물들과 기본적으로 유사한 선천성 면역 체계를 보유하고 있지만 (Uribe et al., 2011) 고도로 잘 발달된 후천성 면역 시스템을 갖고 있는 고등 척추동물들과는 달리 어류는 상대적으로 단순한 후천성면역 체계만을 갖기 때문에, 생체방어를 위한 많은 부분을 선천성 면역에 의존한다. 뿐만 아니라 포유류와는 달리, 어류는 후천성 면역체계가 완전히 완성되지 않는 초기생활사부터 외부 감염원에 대한 노출 가능성이 높기 때문에 어류의 경우 선천성 면역 시스템의 중요성은 여러 포유류들에 비해서 훨씬 더 강조되고 있다(Rombout et al., 2005). 항균 펩타이드(antimicrobial peptide; AMP)는 어류에서 미생물 감염 시 작동하는 제1선의 선천성 방어인자로서 미생물의 인지질층에 구멍을 형성하여 미생물을 사멸시키거나 미생물 막을 통과한 후 세포내 물질과 반응(결합)하여 사멸시키는 메카니즘을 가지고 있고 이러한 살균 작용 기작은 항균 펩타이드가 양전하를 띄고, 친수성 및 소수성 부위를 가진다는 생화학적 특징에 근거한다(Ellis, 2001). 항균 펩타이드를 포함, 직·간접적인 항균기능을 갖는 일부 단백질들은 세균 감염에 대한 선천성 방어 체계로서 철분 격리(iron sequestering) 시스템에 참여함으로써 항균작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 철분 격리에 관여하는 단백질(iron sequestering protein; ISP)은 미생물 증식에 필수적으로 요구되는 철분을 특정 세포의 철분보관 단백질 내에 가두어 격리함으로써 생체로 침입한 미생물들로 하여금 철분이용이 제한되도록 작용한다(Skaar, 2010). 항

균 펩타이드와 철분 격리 단백질의 상호작용에 관한 연구들이 어류에서도 활발히 시작되고 있으나 아직 어류 특이적인 발현 조절 기능, 그리고 AMP와 ISP 기능간의 상호작용 등에 대해서는 보다 많은 연구가 필요한 상태이다.

Hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)는 인간 뇨(urine)에서 처음 발견된 시스테인(cysteine)이 풍부한 베타시트( $\beta$ -sheet)구조의 항균 펩타이드이다 (Krause et al., 2000, Park et al., 2001). 포유류에서 HAMP는 철분 이송 단백질인 ferroportin과의 작용으로 체내 철분의 음성조절자로서(negative regulator) 생체의 항상성 유지(iron homeostasis) 기능을 담당함과 동시에 (Ganz, 2003, Verga-Falzacappa and Muckenthaler, 2005, Viatte et al., 2009) 미생물 감염 시 혈청 내 철분 조절과 항균 펩타이드 기능을 수행하는 이중기능(dual function)을 갖고 있다고 보고되어있다. 즉 HAMP는 세균 증식에 있어 필수요소인 철분을 제한함으로써(iron sequestration) 세균의 성장을 억제시키는 역할을 담당한다(Vyoral and Petrak, 2005). 포유류와 마찬가지로 경골 어류 역시 *hamp* 유전자를 보유하고 있음이 처음 농어과 어류에서 보고된 이래(Shike et al., 2002) 여러 어종에서 hepcidin 유전자들을 발굴, 기능을 평가하고자 하는 연구들이 수행된 바 있다. 기본적으로 포유류에서 알려진 HAMP의 기능이 경골 어류에서도 비교적 잘 보존되어 있음을 나타내는 다양한 실험적 증거들이 보고되고 있다(Rodrigues et al., 2006, Shi and Camus, 2006). 농어목, 가자미목 및 동갈치목을 포함하는 극기류 내에서는 *hamp1*과 *hamp2*가 모두 존재하는 것으로 알려져 있으나 잉어목과 메기목의 어류에서는 포유류와 같이 1개의 isoform만이 존재한다고 알려져 있다 (Hilton and Lambert, 2008). 그리고 *hamp* 발현이 간(liver) 특이적 발현 경향을 나타내는 포유류와는 달리 여러 연구들에서 많은 경골어류들은 다양한 조직들에서 *hamp* 발현을 나타내며 이러한 광범위한 조직 발현 분포는 세

균 감염을 비롯한 면역 자극 조건에서만 아니라 일반적인 비감염 조건에서도 관찰되는 차이점이 보고된 바 있다(Cho et al., 2009, Lee and Nam, 2011). 게다가 농어목 또는 가자미목에 속하는 많은 어류들은 *hamp*의 추가적 복제 또는 분화과정을 거쳐 genome 상에 복수의 유전자 복제수를 보유하고 있다고 보고된 바 있는 등 어류 *hamp* 유전자들도 포유류 *hamp* 유전자에서 알려진 일반적인 유전자 진화 패턴과는 차이를 나타낸다(Cho et al., 2009, Hilton and Lambert, 2008, Huang et al., 2007). 따라서 다양한 *hamp* isoform들의 isoform별 기능의 세분화(subfunctionalization) 또는 단일 *hamp*의 다기능 발휘(mutivalent action)은 어류 분류군 또는 종에 따라서 차이가 있다고 제안된 바 있다(Hilton and Lambert, 2008). 그러나 HAMP의 multifunctional 기능 특히 HAMP1 만을 보유한 어류에서의 HAMP 작용 및 역할에 대한 연구는 아직 부족한 실정이고, 또한 서로 다른 자극 조건에서 유전자 발현 조절 기작에 관한 실험자료 역시 충분치 못한 실정이다.

Liver expressed antimicrobial peptide2 (LEAP2)는 인간의 blood ultrafiltrate (Krause et al., 2003)에서 처음 발견되었고, 두 번째 혈액 유래 항균 펩타이드로 알려져 있다(Krause et al. 2000; Park et al. 2001). 인간 *leap2* 또한 hepcidin과 같이 간 우월적 발현 특징을 지니며 생리학적으로 철분 항상성 및 항균 기능을 하는 것으로 보고된 바 있다(Pigeon et al. 2001). LEAP2 역시 시스테인이 풍부한 양 전하를 띠는 mature peptide로서 작용한다고 알려진 바 있다(Krause et al., 2003). 경골어류 종들에서 발굴된 LEAP2 mature peptide 길이는 41개에서 46개로 종 또는 isoform 별로 차이가 있으며 펩타이드 전체 길이는 91개에서 125개까지 다양하게 보고 되고 있다(Yang et al., 2014). 잉어의 경우 두 종류의 *leap2* isoforms들이 발굴되어 isoform 간 주발현 조직의 경우가 서로 다르지만 대부분의 조직들에서 광범위하게 발현하고, 세균 감염 조건에서 두 isoforms 모두 유도 발현이 이루어짐이 보

고된 바 있다(Yang et al., 2014). 무지개 송어 또한 두 개의 isoform들을 보유한다고 알려져 있으나 앞서 잉어와는 달리 두 isoform들 모두 간 우월적 발현 경향을 나타내며 다른 조식들에서는 발현이 거의 검출되지 않는 특징이 보고된 바 있다(Zhang et al., 2004). 그 외 경골어류 등에서 LEAP2와 관련하여 cDNA 또는 gDNA 유전자 구조, 그리고 기초 발현 등에 대한 연구 정보들이 수집되고 있지만 그 대상어종의 종류가 제한적인 실정이다. 특히 paralogous isoform들을 대상으로 genomic 유전자 정보 및 발현분석의 비교 연구가 수행된 어종들은 무지개송어와 잉어 등 극히 일부어종에 국한되어 있으며 더욱이 paralog isoform들의 프로모터 내 전사 조절인자와 유전자 발현 조절 기작에 관한 연구는 거의 전무한 상태이다.

Warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein (WAP65)는 금붕어 (*Carassius auratus*)에서 처음 발견되었고, 어류의 고온 적응에 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다(Kikuchi et al., 1995). 변온동물인 어류에 있어 새로운 온도(수온)환경에 적응 할 수 있는 능력은 어류의 항상성 유지에 매우 중요시 된다. 그러므로 WAP65 단백질은 어류 온도 적응 분자 메커니즘을 이해하는데 매우 중요한 연구 소재로서 관심을 받고 있다(Kikuchi et al., 1993, 1997, Pierre et al., 2010). 이와 더불어 WAP65가 온도 적응 기능 외에도 스트레스 선천성 면역 및 반응과 밀접히 연관되어 있음을 시사하는 다양한 연구자료들이 축적되면서 온도적응 조절자 뿐만 아니라 생체방어인자로서도 새로이 조명되기 시작하고 있다(Kikuchi et al., 1997, Aliza et al., 2008, Sha et al., 2008, Sarropoulou et al., 2010, Shi et al., 2010, Olsvik et al., 2011). 일반적으로 경골어류는 두 개의 WAP65 isoforms을 발현한다고 알려져 있는데 분자계통유전학 연구를 통해서 *wap65*는 척추동물의 진화과정 중 경골어류에서 특이적으로 획득된 유전자로서 유전자 복제(gene duplication)을 통해서 isoform별 기능의 분화 또는 새로운 기능의 획득이 이

루어졌음이 제안된 바 있다(Sarropoulou et al., 2010). 이에 일부 어종들을 대상으로 WAP65 isoform들의 기능 및 발현 특징 분석에 관한 연구들이 이루어진 바 있지만 아직 2개 paralogous *wap65* isoform들의 분자 생리학적 기능을 단일 어종에서 비교한 연구 결과들은 몇몇 선행 연구들을 제외하면 매우 부족한 실정이다(Hirayama et al., 2003, Nakaniwa et al., 2005, Sha et al., 2008, Sarropoulou et al., 2010).

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 잉어목 미꾸리과 속에 속하는 담수어류 중 하나로서, 우리나라 주요 하천에 널리 서식하는 어종이다. 뿐만 아니라 미꾸라지는 상업적인 측면 이외 실험 동물로서 다양한 장점을 보유하고 있다. 투명하고 빠른 발생속도와 짧은 세대주기, 잘 정착되어 있는 염색체 조작(chromosome-set manipulation) 및 형질전환(transgenesis) 기술 조건 등의 정점에 힘입어 어류 분자유전육종학 연구 모델로서 우수한 가치를 인정받아 불임 배수체 육종, 단성집단생산, 잡종 어류 개발 및 고속성장 유전자 변형 어류 개발 연구에 활발히 이용된 바 있다(Nam et al., 2003). 그러나 아직 미꾸라지의 면역 및 생체 방어 기능에 대해서는 연구 정보가 거의 없는 실정이며 이와 관련한 유용 유전자 발굴 및 기능해석 등도 역시 부족한 상태이다.

이에 본 연구는 미꾸라지의 선천성면역기능 연구의 일환으로 미꾸라지 간에서 발현하는 항균 단백질 유전자의 발현기능을 해석하고자 하였으며 이를 위해 간에서 발현하는 대표적 항균 기능 유전자들인 *hamp*, *leap2* 및 *wap65* 유전자들을 본 어종으로부터 발굴하고 유전자 및 프로모터 구조를 분석하며 다양한 시험 조건하에서 이들 유전자들의 전사 발현 특징을 분석하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. 향균 단백질 유전자들의 transcripts 탐색 및 클로닝

*Hamp* cDNA 클로닝을 위해 미꾸라지 간 및 신장 조직의 EST 데이터베이스로부터 *hamp*와 상동성을 나타내는 partial 염기서열 클론을 확보하였다. 각 클론별 NCBI GenBank를 대상으로 상동성 분석 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 수행한 다음 Sequencher 프로그램(Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 contig assembly를 실시하였다. Full length cDNA 확보를 위해서 MLHAMP1c 1F와 MLHAMP1c 1R 프라이머를 제작하였고, 미꾸라지 간 조직의 cDNA를 주형(template)으로 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 대표 염기서열을 확정하기 위해 상기 RT-PCR 증폭산물의 염기서열을 직접 분석하고(direct sequencing), 이와 함께 pGEM T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝 된 RT-PCR 클론들(TA클론들)의 염기서열 분석을 역시 실시하였다. *Hamp* 유전자 클로닝 및 발현 분석에 이용한 프라이머들과 증폭 조건은 Table 1에 나타내었다.

미꾸라지 간 조직의 발현 유전자 데이터베이스로부터 확보한 *leap2* 단편 서열들을 BLASTx 프로그램을 이용하여 상동성 분석을 수행하였다. 미꾸라지 *leap2* isoform의 cDNA 확보를 위하여 MMcLEAP2a FW2/RV4 프라이머와 MMcLEAP 2b FW1/RV1 프라이머를 제작하였고, 간 조직 cDNA library를 주형으로 사용하여 vectorette PCR을 수행하였다(Table 2). 앞서 *hamp* 유전자 클로닝에서와 마찬가지로 RT-PCR product 및 TA 클론들의 염기서열을 분석하였다.

Table 1. Primers used for isolation, blot analysis and mRNA expression assay of mud loach *hamp* gene.

Primer	Sequence (5' to 3')	Thermal cycling or reaction conditions	Purpose
MLHAMP1c 1F	ACCAATATAGTTTCAGAAAAGCTTTA	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 60 s	Isolation of <i>hamp</i> cDNA
MLHAMP1c 1R	TCAGGAGTCTGGTTTTATAAAAAAGGT		
MLHAMP1-GWR1	CACGCAACGATGAACACAGCAACGAG	7 (1 <sup>st</sup> PCR) or 5 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 68°C for 3min, followed by 32 (1 <sup>st</sup> PCR) or 20 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 72°C for 3min, with a final elongation at 72°C for 7min	Genome walking to 5'-upstream region of <i>hamp</i>
MLHAMP1-GWR2	ACGCGTGAGCTTCATTATCTGCTATG		
MLHAMP1-GWF1	CATAGCAGATAATGAAGCTCACGCGT		Genome walking to 3'-downstream region of <i>hamp</i>
MLHAMP1-GWF2	CTCGTTGCTGTGTTTCATCGTTGCGTG		
MLHAMP1g-FW1	TTCTACATTGTGCCCGTGTC	10 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 3 min, followed by 20 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 3 min, and then a final elongation at 68 °C for 7 min	Isolation of full length genomic <i>hamp</i> sequence
MLHAMP1g-RV1	TAAGCAGTAGACAGTGGGCA		
MLHAMP1-5P1F	ATGGAGCTCATATGGAGGAC	33 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 45 s	PCR-RFLP genotyping of <i>hamp</i> alleles
MLHAMP1-5P1R	TGACAGGATGGTTCATCTGG		
MLHAMP1-probe FW	CATAGCAGATAATGAAGCTCACGC	30 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s	Digoxigenin-labeling of a probe for Southern blot
MLHAMP1-probe RV	CTGTGGTAGTTCACCTGTGG		
ML18S-RV	CAAGAATTCACCTCTAGCGGC		Preparation of normalization control (18S rRNA)
qMLHAMP1 1F	CAAAGTCTGCTCTCCATT	37 °C for 1 h (RT-reaction) 45 cycles at 94 °C for 20 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s	Real-time RT-PCR assay of <i>hamp</i> transcripts
qMLHAMP1 1R	CAACTGGGAAAAGCAGCTC		
qMM 18S 1F	AAGCTCGTAGTTGGATCTCG		Real-time RT-PCR assay of 18S rRNA
qMM 18S 1R	GCCTGAATACCGCAGCTAGG		

Table 2. Oligonucleotide primers and thermal cycling conditions used for molecular cloning and mRNA expression assay of mud loach *leap2* gene.

Primer	Sequence (5' to 3')	Thermal cycling or reaction conditions	Purpose
MMcLEAP2a FW2	GCTGCATTCTCTCGCAAAGT	35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 90 s	Isolation of <i>leap2</i> cDNA
MMcLEAP2a RV4	AAGACAAGACATAAAAATTTTATT		
MMcLEAP2b FW1	CAAAGCTTCCTTTTTTAGG		
MMcLEAP2b RV1	GTGTTTTAGTGGTTTATTTAAC		
MM LEAP2a GW1	TCAGAGCAACACTGCCTACAGAGACGAT	7 (1 <sup>st</sup> PCR) or 5 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 68°C for 3min, followed by 32 (1 <sup>st</sup> PCR) or 20 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 72°C for 3min, with a final elongation at 72°C for 7min	Genome walking to 5'-upstream region of <i>leap2</i>
MM LEAP2a GW2	CAGCATAATAGACACCTAATGCCTCTC		
MM LEAP2b GW1	TTGTACCTCTGTGCTCACCCTGGCA		
MM LEAP2b GW2	CACTAGATACCCGAAGTGTCAGCACA		
MM LEAP2b GW1F	CTCAGTTCTCATGACAAAGGCCACTG		Genome walking to 3'-downstream region of <i>leap2</i>
MM LEAP2b GW2F	TCCTCTATGTGTTGCAAGGGGTATTTG		
MMgLEAP2a pR-1F	ATCGGTGGCTAAACCAGAGA	10 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 3 min, followed by 20 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 68 °C for 3 min, and then a final elongation at 68 °C for 7 min	Isolation of full length genomic <i>leap2</i> sequence
MM cLEAP2a RV3,	TATGAACTGATGAGGCATACAATA		
MMgLEAP2b pR-1F	ACGTCATCTGTGCTGGAGAA		
qMMLEAP2aF	CACCTAAGAGAAGCTGCTCGA	45 cycles at 94 °C for 20 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s	Real-time RT-PCR assay of <i>leap2</i> transcripts
qMMLEAP2aR	GCTATACACCATCATGCACG		
qMMLEAP2bF	GACACTTCGGGTATCTAGTG		
qMMLEAP2bR	CAGGAATGGCCATTGCTCTT		

미꾸라지 *wap65* 유전자의 경우, 간 조직 EST & NGS 라이브러리 데이터베이스를 기반으로 cDNA 유전자들을 탐색하였다. 데이터베이스로부터 수집된 다양한 *wap65* 유사 클론들의 염기서열을 NCBI GenBank와 BLASTx 프로그램을 이용하여 각각 homology 분석 및 확인 작업을 수행하였다. 분석을 통해 두 종류의 *wap* isoform 클론들이 탐색되었고, 이들 두 isoform 염기서열을 각각 *wap65-1* 및 *wap65-2*로 명명하였다. 이를 바탕으로 각 isoform 별 full-length cDNA를 클로닝하기 위해서 mlWap65-1 FW/RV 및 mlWap65-2 FW/RV 프라이머를 제작하여 RT-PCR 분리를 수행하였으며 각 isoform cDNA의 대표 염기서열분석을 상기와 같이 실시하였다(Table 3).

## 2.2. Genomic 유전자 및 5'-flanking 영역의 클로닝

미꾸라지 *hamp* genomic 유전자와 프로모터를 확보하기 위하여 genome walking을 실시하였다. Genome walking을 위해서 Genome Walker Universal Kit (Clontech Laboratories, Inc. Mountain View, CA, USA)을 이용하였고, MLHAMP1-GWR1/GWR2 프라이머를 통해 5'-flanking 영역으로의 walking을 MLHAMP1 GWF1/GWF2 프라이머를 사용하여 3'영역으로의 genome walking을 실시하였다. 각각의 증폭반응에서 확보된 partial fragment들의 염기서열들을 contig assembly한 후 5'-flanking 영역부터 3'-UTR 영역까지 연결된 염기서열을 확보하였다. Contig 서열을 최종 확인하기 위하여 MLHAMP1g-FW1/MLHAMP1g-RV1 프라이머를 사용하여 전체영역을 PCR 증폭한 후 염기서열 분석을 수행하였다(Table 1).

미꾸라지 간 조직의 EST 데이터베이스에서 발견된 2 종류의 *hamp* (*hamp1a* 및 *hamp1b*) 클론들이 형태가 paralog인지 또는 대립유전자 인지를 확인하기 위해 5'-flanking 영역을 대상으로 PCR-RFLP 분석과 Southern blot 분석을 수행하였다. MLHAMP1-5P1F와 5P1R을 사용한 PCR 산물 크기는

Table 3. Oligonucleotide primers and thermal cycling conditions used for molecular cloning and mRNA expression assay of mud loach *wap65* isoform genes.

Primer	Sequence (5' to 3')	Thermal cycling or reaction conditions	Purpose
mlWap65-1 FW	CTGAGCTCTGTCTTGCTTGA	35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 60 s	Isolation of <i>wap65</i> cDNA
mlWap65-1 RV	TTAACCCACAGGTACACAGG		
mlWap65-2 FW	GACTACAGTTCATCATGAACG		
mlWap65-2 RV	ATGCATAGTAGGCATGACCA		
qmlWAP01 1F	GGACCCAATGGGTGACTA	45 cycles at 94 °C for 20 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s	Real-time RT-PCR assay of <i>wap65</i> transcripts
qmlWAP01 1R	GATACATCTGAGCAGAAC		
qmlWAP02 1F	TGCAGCCCATTACTCTCA		
qmlWAP02 1R	CCAAAGTCATAGTACTCTGG		
qML18S 1F	ACCCATTGGAGGGCAAGTCT	20 (for end-point) 45 (for real-time) cycles at 94 °C for 20 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s, with an initial denaturation step at 94 °C for 2 min	End-point or real-time RT - PCR of 18S rRNA control
qML18S 1R	CCTAGCTGAGATATTCAGGC		
ML18S-RV	CAAGAATTCACCTCTAGCGGC	Reverse transcription at 37 °C for 1 h	Preparation of normalization control (18S rRNA)
Wap65-1 GW1	CAGTGCTTAGAGGTGTTGTACTGTG	7 (1 <sup>st</sup> PCR) or 5 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 68°C for 3min, followed by 32 (1 <sup>st</sup> PCR) or 20 (2 <sup>nd</sup> PCR) cycles at 94°C for 25s and 72°C for 3min, with a final elongation at 72°C for 7min	Genome walking to 5'-upstream region of <i>wap65</i>
Wap65-1 GW2	TATATACTCACGAGGGAGCAGTGAAG		
Wap65-2 GW1	GCATTCCAACAAGCAATGCAGATGCA		
Wap65-2 GW2	AATCAGATACTCACGCTGGAGCTGCA		

*hamp1a*와 *hamp1b*가 각각 704 bp 및 718 bp로 확인하였다. 그리고 PCR 산물을 *NdeI* 제한효소(인식영역: CATATG)로 37°C에서 3시간을 처리하였다. *NdeI*을 인식하는 영역은 *hamp1a*와 *hamp1b*의 forward 프라이머 영역과 *hamp1b* 내 영역이므로 *NdeI* 처리 후 *hamp1b*는 524 및 182 bp 밴드가 *hamp1a*는 692 bp의 단일 밴드가 관찰되도록 하였고, forward primer에 존재하는 *NdeI* 인식 위치로 인해 야기되는 12 bp는 매우 작은 크기이므로 고려하지 않았다. 총 18마리의 미꾸라지 개체들을 대상으로 PCR 증폭 및 제한효소 처리를 실시하였다. 또한 어미 개체의 genotype 결과를 바탕으로 인공수정 후 자손 개체들의 genotyping을 추가적으로 수행하였다. 첫 번째 교배 그룹은 *hamp1a/1a* x *hamp1a/1a*의 교배 그리고 두 번째 그룹은 *hamp1a/1a* x *hamp1b/1b*의 교배, 세 번째 그룹은 *hamp1a/1a* x *hamp1a/1b*의 교배를 수행하였다.

미꾸라지 *hamp* 유전자의 genomic organization을 확인하기 위하여 Southern blot hybridization 분석을 수행하였다. Genomic DNA 제한효소 처리는 *DraII*로 선정하였고, 이 제한효소는 미꾸라지 *hamp* 유전자 내 전달 위치가 없는 효소이다. Probe 길이는 465 bp (MLHAMP1-probe FW/RV; Table 1)로 exon 1과 exon II에 걸쳐 있는 영역에 탐침되도록 제작하였다. 분석에 사용한 미꾸라지는 연관관계가 없는 12 마였고, probe 준비, hybridization 및 signal detection은 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science)를 사용하였다.

미꾸라지 *leap2* isoform별 genomic 유전자와 5'-flanking 영역을 확보하기 위하여 Genome Walker Universal Kit (Clontech)를 이용하였다. *Leap2* 유전자의 5'-flanking 영역은 MM LEAP2a GW1/GW2와 MM LEAP2b GW1/GW2 프라이머를 사용하여 염기서열을 확보하였다. 그리고 *leap2* isoforms의 3'-UTR 영역은 MM LEAP2b GW1F/GW2F를 사용하였으며 확보된 partial

fragment들을 contig하여 5'-flanking 영역부터 3'-UTR 영역을 확보하였다. *Leap2* 각 isoform 유전자의 최종 염기서열 확인을 위하여 MMgLEAP2a pR-1F/MM cLEAP2a RV3 프라이머와 MMgLEAP2b pR-1F/MM cLEAP2b RV1 프라이머를 사용하여 PCR 후 염기서열 분석을 수행하였다(Table 2).

*Wap65* isoform genomic 유전자들의 클로닝은 미꾸라지 genomic DNA library를 이용하여 filter hybridization 방법을 통해서 실시하였다. 총  $5 \times 10^6$  genomic plaque 클론들을 대상으로 filter hybridization screening을 실시하였으며, 이때 사용한 탐침은 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 준비한 digoxigenin-labeled *wap65* cDNA였다. 통상의 filter hybridization을 통해서 얻은 양성 클론들을 대상으로 pBluescript KS phagemid vector (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)에 subcloning 한 후 염기서열을 분석하였다. 다양한 *wap65*의 partial 클론들 간의 junction 영역을 PCR 증폭하여 TA 클로닝한 후 contig assembly를 통해 염기서열을 확보하였다. 그리고 contig 서열을 토대로 연속 단편 서열을 확정 짓기 위해서 미꾸라지 genomic DNA를 주형으로 *wap65* 유전자를 다시 PCR 분리 한 후 TA클로닝을 통해서 염기서열의 재확인을 수행하였다. 이 때 필요시, 5'-flanking 영역의 추가 확보는 상기 언급한 바와 같이 미꾸라지 genome walker library를 사용하여 실시하였다(Table 3).

### 2.3. 기초 전사 발현 분석

미꾸라지 *hamp*, *leap2* 및 *wap65* 유전자의 비자극 조건(non-stimulated condition)하에서의 발현 패턴을 조사하고자 성체 조직에서의 mRNA 분포와 발생단계별 발현 특징을 조사하였다. 성체조직 발현 조사를 위해 미꾸라지의 13개 조직(뇌, 눈, 지느러미, 아가미, 심장, 장, 신장, 간, 근육, 비장, 피

부, 난소 및 정소)을 12마리의 건강한 미꾸라지 개체( $30.1 \pm 3.6\text{g}$ )로부터 적출하여 확보하였다. 그리고 시간대별 수정란 자어 확보를 위하여 6미의 암컷에서 확보한 pooling된 난과 6미의 수컷에서 확보한 pooling된 정액을 수정시켰다. 산란을 위한 호르몬 처리 및 인공 산란 유도 기술은 선행 연구를 참고하였다(Kim et al., 1994). 수정란 유지 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 부화까지 유지하였다. 평균 수정율과 부화율은 각각 98.5% 및 89.3%였고, 샘플링을 위하여 약 300개의 수정란과 자어를 사용하였다. 샘플링은 수정 후 0 (just fertilized), 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 (just hatched) 및 28 (D0) 시간째 수행하였고, 부화 후 1일(D1) 및 2일(D2)째 역시 실험 자어를 샘플링 하였다.

## 2.4. 다양한 실험 자극에 따른 발현 분석

### 2.4.1. HAMP

미꾸라지 *hamp* 유전자의 면역 자극원에 대한 유도 발현 여부 및 iron sequestering protein (ISP)로서의 작용 가능성 확인을 위하여 아래와 같이 네 종류의 실험 자극 처리들을 실시하였다. 첫 번째 실험은 박테리아 lipopolysaccharide polysaccharide (LPS; *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA;  $5 \mu\text{g/g}$  body weight [BW])와 polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C); Sigma-Aldrich] ( $25 \mu\text{g/g}$  BW) 처리로서 미꾸라지( $10.5 \pm 2.1 \text{ g}$ ; 8미/그룹)에 복강주사를 통해 실시하였다. 대조군은 동일량의 생리식염수(saline)를 주사하였고, 주사 후 60 L 수조에 수용하였다. 실험기간 동안 수온은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 24시간 후 장, 간, 신장 및 비장 조직을 적출 후 분석에 이용하였다. 두 번째 실험은 병원성 세균 *Edwardsiella tarda* (Gram negative; FSW910410)의 감염에 대한 발현 양상을 조사하기 위해 실시하였다. 미꾸라지에( $13.6 \pm 3.8 \text{ g}$  BW; 10미/그룹) 농도별 *E. tarda*를 주사하였고( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , or  $5 \times 10^6$  cells/g BW), 대

조균의 경우 동일한 PBS를 주사하였다. 주사 24 시간 후 장, 신장 및 간 조직을 샘플링하여 유전자 발현 분석을 실시하였다. 세 번째 실험은 다양한 종류의 세균 감염 공격에 대한 *hamp* 유전자의 발현 반응을 조사하기 위해 수행하였다. 이를 위해서 3 종류의 그람 음성균 *Vibrio anguillarum* (Gram negative; KFCC-11377P), *Vibrio harveyi* (Gram negative; ATCC 14126) 및 *Vibrio vulnificus* (Gram negative; ATCC 27562)과 3 종류의 그람 양성균 *Lactococcus garvieae* (Gram positive; ATCC 49156), *Streptococcus iniae* (Gram positive; JSL0108) 및 *S. parauberis* (Gram positive; KCTC 3651)을 사용하여 각각 미꾸라지(12.9±4.1 g BW; 10미/그룹)를 감염시켰다. 감염 농도는  $1 \times 10^6$  cells/g BW으로 하였고, 대조군은 PBS를 동일 양 주사하였다. 주사 48시간 후 신장, 간 및 비장 조직을 적출하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. 네 번째 실험은 미꾸라지 *hamp* 유전자의 철분 과부화에 따른 발현 특성을 확인하기 위하여 미꾸라지(1.5±3.6 g BW; 6미/그룹)에 0 (PBS), 0.1, 0.5 그리고 1.0 mg/g BW의 농도로 주사하였고, 24 시간 노출 뒤 장, 신장, 간 및 비장 조직을 적출하여 mRNA 발현분석을 수행하였다.

#### 2.4.2. LEAP2

미꾸라지 *leap2*의 발현 조절 기작을 탐색하기 위해서 세균 감염 및 철분 과부화 그리고 중금속 노출에 대한 *leap2* isoform별 차등 발현 여부를 조사하기 위하여 isoform별 mRNA 발현을 분석하였다. 첫 번째 실험은 *E. tarda* (FSW910410)감염 실험으로 6미의 미꾸라지에  $1 \times 10^6$  cells/g BW을 PBS (pH 6.8)에 희석하여 200  $\mu$ l를 미꾸라지 복강에 주사하였고, 대조군은 동일 양의 PBS를 주사하였다. 주사 후 6, 12, 24, 48, 96 및 192 시간이 경과된 시점에서 간, 신장 및 비장 조직을 샘플링 하였다. 두 번째 실험은 2 종류의 그람 음성균 *V. harveyi* (Gram negative; ATCC 14126) 및 *V. vulnificus*

(Gram negative; ATCC 27562) 그리고 2종류의 그람 양성균 *L. garvieae* (Gram positive; ATCC 49156) 및 *S. iniae* (Gram positive; JSL0108)를 사용하여 미꾸라지 감염을 유도한 후 발현 변화를 조사하였다. 이때 사용한 미꾸라지는  $12.9 \pm 4.1$ g의 평균 어체중을 갖는 개체들이었고, 시험구 당 10미씩을 포함하도록 하였다. 감염 농도는  $1 \times 10^6$  cells/g 어체중(BW)으로 하였고, 대조군은 동일량의 PBS를 주사하였다. 48시간 후 신장, 간 및 비장 조직을 적출하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. 세 번째 실험은 철분 과부화에 따른 *leap2* 유전자의 ISP 작용 가능성을 확인하고자하는 실험이었다. 미꾸라지 ( $1.5 \pm 3.6$  g BW; 6미/그룹) 실험개체들을 대상으로 어체중 g당 0 (PBS), 0.1, 0.5 그리고 1.0 mg의 iron dextran (Sigma-Aldrich)을 주사하였다. 24시간 후 신장, 간 및 비장 조직을 적출하여 분석에 이용하였다. 네 번째 실험은 중금속 처리에 따른 *leap2* 유전자의 mRNA 분석 실험으로 7 종류의 중금속 [cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mg), nickel (Ni) 및 zinc (Zn); Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA]을 처리 후 발현 변화를 분석하였다. 침지 노출을 위해서 20L 수조에 각 중금속 처리구 당  $5 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리 수조를 준비한 후 수조당 6개체의 미꾸라지 ( $10.8 \pm 2.5$ g)를 수용하였다. 노출시작 24 시간 후 1회 환수(50%) 하였고, 이때  $5 \mu\text{M}$  중금속을 포함하는 사육수를 이용하였다. 최초 노출처리 48 시간 후 간 조직을 적출하여 mRNA 분석에 이용하였다.

#### 2.4.3. WAP65

첫째, 미꾸라지의 온도 처리에 따라 *wap65* isoform들의 발현 양상을 확인하기 위하여 수온 변화 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 미꾸라지는 연구실에서  $22-26^\circ\text{C}$ 의 담수와 100 L 수조에서 사육한 개체들로서 실험 2주 전  $25^\circ\text{C}$ 에서 적응 시킨 개체들이었다. 고온 자극 실험을 위해서 60 L 수조

에 6미를 옮긴 후 25°C에서 시간 당 1°C씩 32°C까지 상승시켰고, 32°C에 도달 후 1시간 후에 간 조직을 적출하였고, 저온 실험도 동일한 수조를 이용하여 시간당 2°C씩 11°C까지 하강시킨 후 11°C에서 2시간 유지 후 역시간 조직을 적출하였다. 둘째, 면역 자극원에 따른 발현 조절 양상 조사를 위해 LPS injection과 박테리아 공격실험(*E. tarda*; Gram negative)에 따른 *wap65* isoform별 발현 특징을 조사하였다. 미꾸라지(11.2±2.4 g)의 복강에 LPS (*E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich)를 5 µg/g BW으로 주사하였고, 대조군은 동일한 양의 saline을 주사하였다. 처리군 및 대조군은 각각, 6미씩의 미꾸라지 개체를 이용하여 마련하였다. 주사 후 60 L 항온 수조(25°C)에서 24시간 유지한 후 간 조직을 적출하여 분석에 이용하였다. 세균 감염 실험은 PBS 현탁시킨 *E. tarda*를 1x10<sup>7</sup> cells/g BW의 농도로 미꾸라지 복강에 주사한 후 60 L의 수조에서 25°C의 온도 조건으로 24, 48 및 96 시간 동안 유지하면서 간 조직을 샘플링 하였다. 대조군은 동일한 양의 PBS를 주사하였다. 셋째, 미꾸라지 *wap65*의 중금속 노출에 대한 isoform 별 차등 발현 양상 조사를 위하여 3 종류의 중금속[cadmium (Cd), copper (Cu) 및 nickel (Ni); Sigma-Aldrich]에 노출 실험을 실시하였다. 이를 위해 각 중금속 처리구당 5 µM의 농도를 포함하는 실험 수조(20 L)를 준비하였고, 각 수조에 미꾸라지 6개체(평균 10.8±2.5 g)씩을 수용하며 노출 실험을 실시하였다. 이때 무처리 대조군은 중금속을 제외한 다른 조건들을 모두 동일하게 하여 준비하였다. 중금속 노출 24시간째 50% 수량을 각 수조 별로 환수하였고, 이때 일정한 중금속 농도가 유지되도록 중금속을 다시 처리하였다. 최초처리 48시간 경과 시점에서 대조군을 포함한 각 시험구별 6개체들로부터 간 조직을 적출하여 분석에 이용하였다.

## 2.5. mRNA 정량 PCR 분석 및 통계처리

Total RNA 분리는 Tripure Reagent (Roche Applied Science)와 RNeasy plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다. cDNA 합성은 Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany)에 18S rRNA를 역전사 반응물 내에 포함시켜 normalization을 위해서 ML18S-RV (0.1  $\mu$ M at the final concentration)를 첨가하여 역전사를 함께 시켰다. Semi qRT-PCR 및 real-time RT-PCR 수행을 위하여 각 유전자 별로 예비실험을 통해 최적화된 프라이머 쌍을 디자인하였고, *hamp* (qMLHAMP1 1F/1R)와 *leap2a* (qMMLEAP2a F/R), *leap2b* (qMMLEAP2b F/R), *wap65-1* (qmWAP01 1F/1R), *wap65-2* (qmWAP02 1F/1R) 그리고 normalization control 유전자인 18S rRNA (qMM 18S 1F/1R)의 증폭에 이용한 프라이머들은 앞서 Table 1~3에 나타내었다. Quantitative PCR 증폭을 위하여 LightCycler480 System (Roche Applied Science)와 LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science)를 사용하였으며 PCR 결과 분석은  $2^{-ddCt}$  방법과 Student's t-test 또는 ANOVA(Duncan's multiple range test)를 이용 통계적 유의차를 P=0.05 수준에서 검증하였다.

## 2.6. 생물정보학 분석

항균 단백질 유전자의 5'-flanking 영역의 전사조절 인자 분석을 위하여 TF search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)를 이용하였고, signal peptide와 propeptide cleavage site를 prediction 하기 위하여 SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), ProP 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>)를 이용하였다. 유전자 서열을 아미노산으로 치환하여 분자량(Mw), 등전점(pI)을 ExpASy ProtParm

(<http://web.expasy.org/protparam/>)을 이용하여 계산하였다. 아미노산 서열 다중 배열 분석(multiple alignment)를 위하여 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)을 이용하였다. 그리고 단백질 3차 구조 모형을 예측하고 그림을 수정하기 위하여 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)와 3D model viewer (Swiss-PdbViewer)를 이용하였다.



## III. 결과

### 3.1. 항균 단백질 유전자들의 cDNA 및 아미노산 서열 특징

#### 3.1.1. HAMP

미꾸라지 *hamp*의 cDNA 유전자(GenBank accession number= JN230708)는 183 bp의 5'-UTR, 273 bp의 ORF 그리고 378 bp의 3'-UTR 로 구성되어 있었으며 ORF는 91개의 아미노산으로 암호화하고 있었다. Polyadenylation signal 위치는 polyA tail로부터 -18 bp에 있었으며 염기서열은 aataaa로 나타났다. 클로닝 과정 중 염기서열의 변이를 나타내주는 미꾸라지 *hamp* cDNA 클론들이 확인되었고 이들은 coding region에서 염기서열 치환을 보이지만 wobble 형태로서 아미노산 치환은 발생하지 않았다. 미꾸라지 HAMP polypeptide내에서 2개의 cleavage sites가 관찰되었는데 signal peptide cleavage site는 24번째 아미노산(Ala)과 25번째 아미노산(Ser)사이에 위치하였고, propeptide cleavage site (RXRR 또는 RXKR)는 66번째 아미노산(Arg)과 67번째 아미노산(Gln) 사이에 위치하였다. Signal peptide는 24개의 아미노산 (pI=8.94), propeptide는 42개의 아미노산(pI=8.15) 그리고 mature peptide는 25개의 아미노산(pI=8.94)으로 구성되어 있었다. 미꾸라지 HAMP의 mature peptide영역과 다른 종들의 HAMP matured peptide 영역들과의 alignment 결과 아미노산의 길이와 cysteine 잔기들의 위치가 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. HAMP mature peptide 내 총 8개의 cysteine 잔기들은 4개의 이화황 결합을 형성하는 것으로 예측되었고, 또한 미꾸라지 HAMP에서 발견된 Gln-Ser-His-Leu/Ile-Ser (Q-S-H-L/I-S) motif는 대부분의 어류

HAMP1 peptide에서 관찰되었다(Fig. 1).

### 3.1.2. LEAP2

미꾸라지 *leap2* isoforms 가운데 *leap2a*의 cDNA는 5'-UTR이 268 bp, ORF가 279 bp 그리고 3'-UTR이 969 bp이었다. Polyadenylation signal의 염기서열은 aataaa로 확인되었으며 위치는 poly(A<sup>+</sup>) tail을 기점으로 -24 bp에서 관찰되었다. 반면 *leap2b*는 33 bp길이의 5'-UTR과 273 bp의 ORF 그리고 549 bp의 3'-UTR로 구성되어 있었으며 polyadenylation signal (aataaa)는 poly(A<sup>+</sup>) tail을 기점으로 -18 bp에서 관찰되었다. LEAP2a는 93개의 아미노산을 암호화하고 있었고, signal peptide, propeptide 및 mature peptide는 각각 28, 24 및 41개의 아미노산으로 구성되어 있었다. LEAP2b는 아미노산 개수가 LEAP2a보다 2개 적은 91개였고, 3개의 peptide 영역들은 각각 27, 23 및 41개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 미꾸라지 LEAP2a 및 2b 모두 mature peptide 영역의 길이는 동일하여 서로 유사한 분자량(Mw)을 나타내었지만(LEAP2a=4618.29 Da 및 LEAP2b=4662.35 Da) 등전점 값(pI)은 서로 큰 차이를 나타내었다. 다른 어류들과의 mature peptide 영역을 alignment한 결과 LEAP2a 내에서 미꾸라지와 가장 상동성이 높은 어류는 초어(*C. idellus*)와 잉어(*C. carpio*)로서 95%의 상동성을 보였고, 그와 반대로 점박이가아와(*L. oculatus*)는 가장 낮은 58%의 상동성을 나타내었다. 그리고 미꾸라지 LEAP2b와 가장 상동성이 높은 ortholog는 잉어 LEAP2로서 90%의 상동성을 나타내었고, 그와 반대로 무지개송어(*O. mykiss*) LEAP2와 가장 낮은 56%의 상동성을 보였다(Fig. 2). 미꾸라지 LEAP2a와 LEAP2b는 서로 60%의 상동성을 갖고 있었다. 미꾸라지 LEAP2 두 isoforms 모두는 HAMP와 마찬가지로 propeptide cleavage 인식 영역 RXXR (LEAP2a; RTAR 및 LEAP2b; RIAR)이 관찰되었다. 미꾸라지 LEAP2a 및 LEAP2b의 mature

			aa	pI	accession #		
<i>Misgurnus mizolepis</i>	MMI	QSHLSMCRYCCKCCR-N-KGCGFCKKF	25/8.94		JN230708	Cypriniformes	Ostariaphysi
<i>Danio rerio</i>	DRE	QSHLSLRFCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.94		AAR18592		
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	HNO	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.74		AC051156		
<i>Puntius sarana</i>	PSA	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.74		CA268137		
<i>Pimephales promelas</i>	PFR	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.74		DT343090	Siluriformes	
<i>Ictalurus punctatus</i>	IFU	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.75		ABA43709		
<i>Ictalurus furcatus</i>	IFU	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.75		AAK39714		
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	PFU	QSHLSLRYCCMCR-N-KGCGYCKKF	25/8.75		ABV46065		
<i>Galus marhua</i>	GMO1	QSHLALRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ACA42770	Gadiformes	Paracanthopterygii
	GMO2	QSHLALRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ACA42769		
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	OMY	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.53		ADU85830	Salmoniformes	Protacanthopterygii
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	OTS	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.53		EL553897		
<i>Salmo salar</i>	SSA1	QSHLSLRWRNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.85		AC169335		
	SSA2	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.53		NP_001134321	Beloniformes	
	SSA3	QSHLSLRGLCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/7.73		AA085553		
<i>Oryzias javanicus</i>	OJA	QSHLSMCRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.52		IF419325		
<i>Oryzias latipes</i>	OLA	QSHLSMCRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.52		FM166049	Cyprinodontiformes	
<i>Fundulus heteroclitus</i>	FHE	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.75		CN990077		
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	GAC	QSHLSMCRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.92		ENS6ACP0000016484	Gasterosteiformes	
<i>Scophthalmus maximus</i>	SMA1	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.75		AA92670		
	SMA2	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.75		CA134592	Pleuronectiformes	
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	PAM	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.75		AW1013026		
<i>Platichthys flesus</i>	PFL	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.75		DV568154		
<i>Paralichthys olivaceus</i>	POL	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	25/8.75		AAT01563		
<i>Gillichthys mirabilis</i>	GMI	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.94		EB648659	Acanthopterygii	
<i>Lycodichthys dearborni</i>	LDE	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.75		ABY84843		
<i>Pogonophryne scottii</i>	PSC	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ABY84821		
<i>Dissostichus mawsoni</i>	DMA	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ABY84824		
<i>Eleginops maclovinus</i>	EMA	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ABY84822		
<i>Notothenia angustata</i>	NAN	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ABY84825		
<i>Perca fluviatilis</i>	PFL	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		DT901803		
<i>Dicentrarchus labrax</i>	DLA	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		DV216833		
<i>Larimichthys crocea</i>	LCR	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ABC18307		
<i>Micropterus salmoides</i>	MSA	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.78		ACD13023		
<i>Micropterus dolomieu</i>	MDO	QSHLSLRWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.76		ACD13025		
<i>Sparus aurata</i>	SAU	QSHLSMRYWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.50		CB177060		
<i>Lithognathus mormyrus</i>	LMO	QSHLSMRYWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.50		EB507090		
<i>Pogrus auriga</i>	PAU	QSHLSMRYWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.51		BAH03285		
<i>Seriola quinqueradiata</i>	SQU	QSHLSMRYWCCNCR-N-KGCGYCKKF	26/8.54		AU312565	Perciformes	

Fig. 1.

Multiple sequence alignment of mature mud loach HAMP peptide along with teleostean orthologues. Seven Cys residues conserved in all the organisms are indicated by asterisks while a Cys residue conserved in most species with an exception for an hepcidin isoform from *Salmo salar* (SSA1; AC169335) is noted by closed circle. Number of amino acid and theoretical pI value of each peptide sequence are also noted at the end of each sequence.

Species	Mature peptide	pI	Mw	Accession#
<i>M. miiuy</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTSHRATSETVNY	8.48	5187.82	AHN13906
<i>L. crocea</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTSHRATSETVNY	8.48	5187.82	AHY01375
<i>S. partitus</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTSHRSPSEPVNY	8.48	5208.84	XP008292487
<i>P. olivaceus</i>	MTPLWRIMSSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTSHRSPAEPVKY	8.86	5166.89	ACB97648
<i>O. niloticus</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTMNRSASQPVNY	8.88	5189.90	XP003457771
<i>H. burtoni</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTMNRSASQPVNY	8.88	5189.90	XP005951092
<i>P. nyerelei</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTMNRSASQPVNY	8.88	5189.90	XP005750985
<i>M. zebra</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> FGAYCQNNYECSTGLCRAGHCSTMNHSASQPVNY	8.48	5170.85	XP004573478
<i>T. rubripes</i>	MTPLWRIMNSKPF <sup>*</sup> EGAYCQNSYECSTGLCRAGHCSTFSQSPSQIANY	8.88	5192.88	XP003966912
<i>P. reticulata</i>	MTPLWRIMSSKPSGAF <sup>*</sup> CQNNFECATGLCREGRCSTNQRPSSEPVKY	8.91	5169.89	XP008433570
<i>P. formosa</i>	MTPLWRIMSSKPSGAF <sup>*</sup> CQNNFECATGLCREGRCSTNQRPSSEPMKY	8.91	5201.95	XP007561807
<i>O. latipes</i>	MTPLWRIMSSKPSGAF <sup>*</sup> CQNNFECSTGLCRAGHCATNQR--SEAVKY	8.91	4916.59	XP004080006
<i>C. idella</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTYSQPIINS----	8.86	4657.33	ACR54299
<i>M. amblycephal</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTYSQPIINS----	8.88	4685.34	AFO84708
<i>M. mizolepis_a</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTYSQPIINS----	8.88	4618.29	Present study
<i>C. carpio_a</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTYSQPIHNS----	8.86	4657.33	AGK89728
<i>D. rerio</i>	MTPLWRIVGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRMGHCSTYSQPVNS----	8.48	4579.17	AAI62807
<i>I. furcatus</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTFSQPIINS----	8.88	4617.35	AAX45792
<i>I. punctatus</i>	MTPLWRIMGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTFSQPIINS----	8.88	4617.35	AAX45791
<i>T. fulvidraco</i>	MTPLWRIVGTPHGAYCQNNHYECSTGLCRKGCSTFSQPIINS----	8.88	4585.29	ACT33044
<i>A. mexicanus</i>	MTPLWRIMGTPKPYGAYCQNNHYECSTGVCNRNGHCTFSQPIKNS----	8.88	4609.28	XP007248122
<i>O. mykiss_a</i>	MTPLWRIMGTPKPYGAYCQNNHYECSTGLCRGGHCFMSQPIKNS----	8.86	4604.37	NP001117936
<i>L. oculatus</i>	MTPLWRSIGIKPHGAYCKDSFECTTKVCREGHCSYQHFQS----	8.46	4720.37	XP006632859
<i>O. mykiss_b</i>	MTPLWRIMGTPKPYGAYCRDHFECSTGLCRGGHCFMSQPIKNS----	8.94	4613.32	NP001117937
<i>M. mizolepis_b</i>	MSPLWRIMAFKPYGAYCQDNIECTTGLCRNGHCSFNEPVHA----	6.68	4662.35	Present study
<i>C. carpio_b</i>	MSPLWRIMGFKPYGAYCHDNEICTTGLCRNGHCSFNEPVHS----	6.79	4685.38	AGK89729
<i>H. sapiens</i>	MTPFWRGVSLRPIGASCRDDSECTITRLCRKRRCSLSVAQE-----	9.37	4585.30	BC070199
<i>M. musculus</i>	MTPFWRGVSLRPIGASCRDDSECTITRLCRKRRCSLSVAQE-----	9.37	4685.38	BC089593

Fig. 2.

Multiple alignments of mud loach LEAP2 mature peptides along with representative teleostean and mammalian species. Four Cys residues conserved in all the organisms are indicated by asterisks. Number of theoretical pI value and molecular weight (Mw) of each peptide sequence are also noted at the end of each sequence

peptide 내 존재하는 4개의 cysteine 위치 또한 다른 어류들의 orthologues들과 비교 시 잘 보존되어 있었다. LEAP2a (pI=8.88)는 양전하 값을 갖는 것으로 확인된 반면 LEAP2b (pI=6.68)는 중성인 것으로 확인되어 기능적인 분화 또는 활성의 차이가 예상되었다. 미꾸라지 LEAP2의 mature peptide 영역을 대상으로 3D 모델링 분석을 실시한 결과  $\beta$ -sheet 구조를 기본으로 하는 3D 모델이 구축되었고, LEAP2a 및 LEAP2b 2개의 이화황 결합을 형성하는 것으로 예측되었다. 두 isoform들은 동일하게 matured peptide 17번째 cysteine과 28번째 cysteine간, 그리고 23번째 cysteine과 33번째 cysteine간에 이화황 결합을 이루는 것으로 예상되었다(Fig. 3.).

### 3.1.3. WAP65

미꾸라지 *wap65-1*과 *wap65-2* 각각 457 및 446개의 아미노산으로 암호화하고 있었다. 유추된 아미노산 서열을 이용하여 계산한 분자량은 WAP65-1 및 WAP65-2에서 각각 51.8 및 50.7 kDa이었으며 pI 값은 6.52 및 5.69로 확인되었다. SignalP 예측 결과 19번째 아미노산과 20번째 아미노산 사이에서 signal peptide cleavage site가 존재하였다(Fig. 4). 두 종류 WAP65 isoforms은 아미노산 수준에서 서로 45.7%의 낮은 상동성을 나타내었다. 인간의 hemopexin 및 다른 어류들의 WAP65들과의 alignment를 수행한 결과 인간의 hemopexin과 미꾸라지 WAP65-1 및 WAP65-2는 각각 32% 및 37%로 낮은 상동성을 나타내었지만 heme 결합을 위한 histidine 잔기가 인간 hemopexin에서 2개, WAP65-1에서 1개 및 WAP65-2에서 2개가 공통 영역에서 관찰되었고, aromatic 잔기 또한 인간의 hemopexin과 WAP65-2가 공통적으로 6영역이 관찰되었다. 그리고 미꾸라지 WAP65 isoform간에는 10개의 cysteine 잔기가 관찰되어 5개의 이화황 결합이 형성하는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 미꾸라지 WAP65-1의 아미노산과 가장 높은 상동성을 나타내는

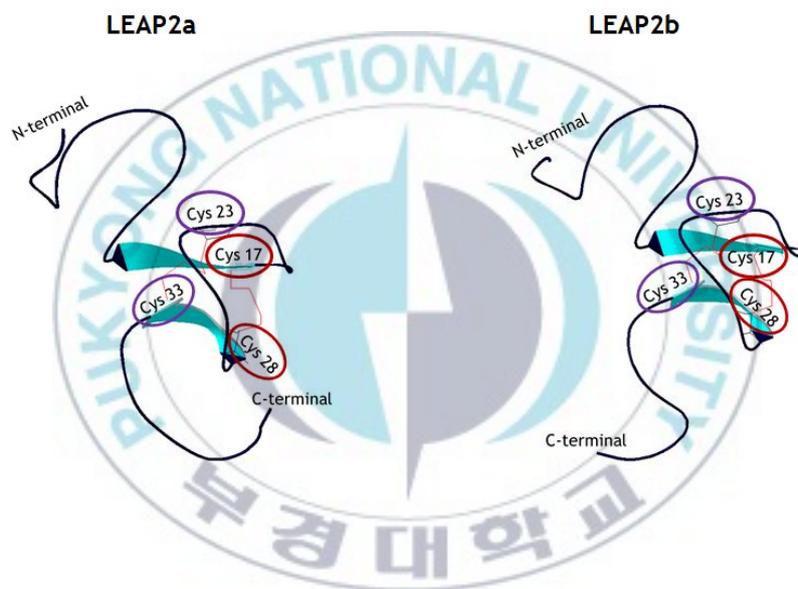


Fig. 3.

Predicted 3D model structures of mud loach LEAP2 isoforms. Cysteine residues predicted to form disulfide bonds in each isoform were indicated by circles.

WAP65-1 MRLLVQILLCIALTLAFTAPSQHEHREKSEKSGKSGKPKDCHWFKXHFPEKIDRCAGVDFDAAVDEDCVLHFFKGMLEFKSGCKSELNKTFAELDDAHLGHVDAITLMS 120  
 WAP65-2 **MNVFFLCVCLALFRSIFAPAHLLDMMADAUKDHSFKG-----EDHDAQLDRCKNGIEFDAITFDKSGSIFFFKAGLHWNGFGFALNSGTFKEMDEYHLHGHIDAFRMHH** 110  
 WAP65-1 EDSPEHMQFFLLENKVFSEYKHKLENGYPRDISEVFFGIPDHLDAVQCHKPECEFDIVLFFKGNMYYHFVLIKVKYDEKELKGNPNTGAFKQKMHYFCLHGHQFSKFDITGEVHG 240  
 WAP65-2 **KDDPTAHDHVFTEFLDKVFSYVDHTELEKGYRHEIQCEFFDIPWHLDAVCEKGCETVDSVLLFKGNEVYHFDIKTKLTKKWSHLNCTSAFRLEHYVCFHGHSTFRFPVSGEYTG** 230  
 WAP65-1 KYKRETRGYETKCSKFNKTTAEHIEREKSKVHLDAITSDDDGNMHAFRG--NHFLSKTGEKFSHSDTIENAFKGVGVDAAFSTEGHFTIWKDDRVFANIKESHFFVGEFFKELKEV 358  
 WAP65-2 **EYKDAHYFMSG--EGFGHGASTRMOKSEIKLNAAIIDKGREYAFQGSVYMLDERDQGHFFFIIRQWELISGEVDAVFSYGDNNYFIQGDQVYIKGAAHYTLIEG7FKFLKEE** 348  
 WAP65-1 LGIEDHICRAFYCAKQDDVHVTKGOTLYKVDKCATPRAAVKEGTTAFKVDTCMGPNNGVITIGNHFYVDSIMVLMKIMPTOKNVSHDIFGCDH 457 aa; 51.8 kDa; pI = 6.52  
 WAP65-2 **LGIEGFDHRAFYCGENIIVHIIQGGKAYDIDITASPRAITREMPPIP-KVDAVCAAGKQVTEGSEYVQCSQSMVLAQAKMHPHHSPEPFGCEE** 446 aa; 50.7 kDa; pI = 5.69

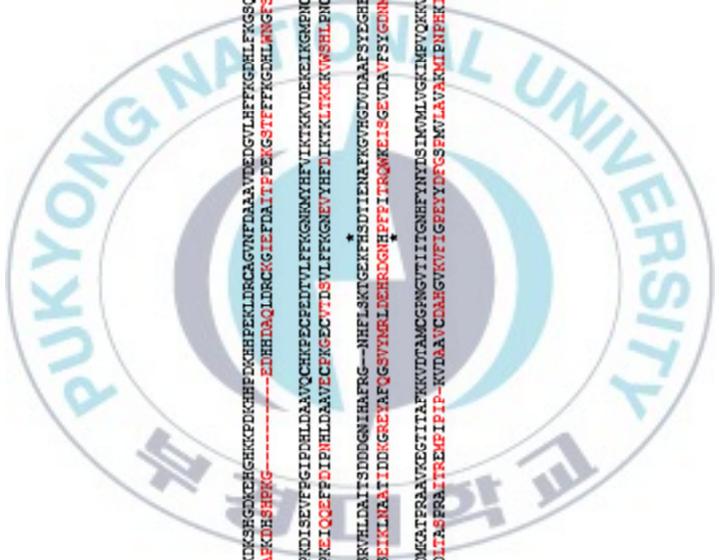


Fig. 4.

Pairwise alignment of mud loach WAP65-1 and WAP65-2 amino acid sequences. The putative signal peptide cleavage sites of the two isoforms are indicated by vertical arrows. Histidine residues for putative heme binding are marked with asterisks, and the five pairs of conserved cysteine residues that form disulfide bridges are in bold.



Fig. 5.

Partial multiple sequence alignment with teleost WAP65 orthologues and human hemopexin (HPX). In the partial alignment, residues conserved in all the sequences are noted by asterisks and the two histidine residues involved in heme binding of human hemopexin (HPX) are indicated with open circles. Aromatic residues in the heme-binding pocket are underlined in the human HPX sequence. The conserved residues unique to the fish WAP65-2 proteins and human hemopexin are in bold.

어류는 잉어(*C. carpio*; Cypriniformes)로 66%의 상동성을 보여주었고, 미꾸라지 WAP65-2와 가장 높은 상동성을 가지는 어류는 차넬 메기(*I. punctatus*; Siluriformes)로 68%의 상동성을 나타내었다.

## 3.2. Genomic 유전자 구조 및 프로모터 영역의 특징

### 3.2.1. HAMP

미꾸라지 genomic *hamp* (GenBank accession number = JN230710)는 다른 척추동물의 *hamp* 유전자와 마찬가지로 3개의 exon (87 bp, 90 bp 및 99 bp for exons I, II 및 III)과 2개의 intron (311 bp intron I과 516 bp intron II)으로 구성되어 있었고, GT-AG의 exon-intron boundary 규칙을 따르고 있었다 (Fig. 6). 그러나 cDNA 수준에서 관찰된 염기 변이가 genomic DNA 상에서도 역시 관찰되어 2 종류의 genomic *hamp* 유전자가 확인되었고, *hamp1a* 및 *hamp1b* (GenBank accession number = JN230711)로 명명하였다. 이들 *hamp1a*와 *hamp1b*간 염기변이는 exon II, intron II, 5'-flanking 영역 및 3'-UTR이었으나 exon II에서 관찰된 염기변이의 경우 아미노산 치환은 유발하지 않았다(Fig. 6). 관찰된 두 종류의 *hamp* 유전자가 대립유전자인지 또는 paralogous copy인지를 확인하기 위하여 PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 방법을 사용하여 *hamp1a*, *hamp1b*를 구분하였다. 그 결과, PCR-RFLP 밴드 패턴에 따라 3가지 그룹으로 대변할 수 있었다. 그룹 I은 692 bp의 *hamp1a*만을 표현하였고, 그룹 II는 542 bp 와 182 bp 크기의 두 밴드를 나타냄으로써 *hamp1b*만을 표현하는 그룹이다. 반면 그룹 III는 692 bp, 542 bp 및 182 bp가 모두 관찰되는 패턴으로 *hamp1a/hamp1b*를 표현하는 그룹이었다(Fig. 7, 8). 상기 결과를 바탕으로 그룹간의 교배 후 자손 검정을 실시한 결과, 교배 I에서 분석한 자손 모두 *1a/1a*로 형태로

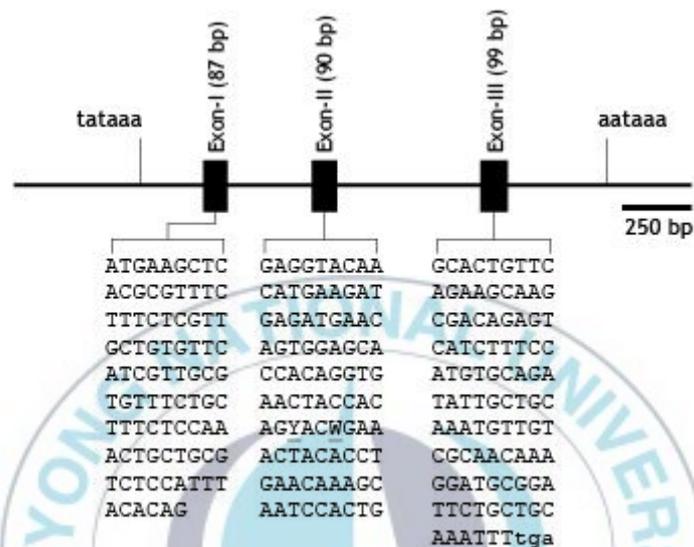


Fig. 6.

Tripartite organization of mud loach *hamp* gene. Coding nucleotide sequence and deduced amino acid in a singlet code of each exon are shown. Two potential cleavage sites respectively for 24-aa signal peptide (between Ala24 and Ser25; predicted by SignalP 3.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and 25-aa mature peptide (between Arg66 and Gln67; ProP 1.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>) are indicated by arrowheads. In exon II, two degenerate nucleotides underlined (Y and W) are allelic differences between *hamp1a* and *hamp1b* (Y = cytosine for HAMP1a and thymine for HAMP1b; W = adenine for HAMP1a and thymine for HAMP1b).



Fig. 7.

PCR-RFLP strategy to perform allelic genotyping of mud loach *hamp* gene. Nucleotide sequence alignment of the selected 5'-flanking regions from *hamp1a* and *hamp1b* used for PCR-RFLP genotyping. To distinguish the *hamp1a* from *hamp1b* allele, 704 bp (for *hamp1a*) or 718 bp (for *hamp1b*) were PCR-amplified using a pair of conserved primers (MLHAMP1-5P1F/5P1R; indicated by arrows) and the PCR product (5 μL) was digested with *NdeI* (CATATG; boxed).



Fig. 8.

PCR-RFLP genotyping of *hamp* alleles with 18 unrelated mud loach individuals. In the gel, nine mud loach individuals (#1, #2, #5, #7, #8, #10, #11, #13 and #16) indicate that they possess only *hamp1a* allele (i.e., *hamp1a/1a* homozygous). On the other hand, five individuals (#3, #6, #9, #15 and #18) are *hamp1b/1b* homozygous. Finally, the remaining four individuals (#4, #12, #14 and #17) are heterozygous possessing both alleles (*hamp1a/1b*).

나타났고, 교배 II는 1미를 제외한 나머지 자손 모두 *1a/1b* 형태로 조사되었다. 교배 III는 *1a/1a* 형질의 개체, *1a/1b*개체 모두 확인되었다(Fig. 9). 미꾸라지 *hamp* 유전자의 genomic organization을 확인하기 위한 southern blot 결과 12미 가운데 1미만 single copy를 가지고 있었고, 나머지 개체는 모두 2개의 hybridization bands들을 나타내었다(Fig. 10).

생물정보학 분석으로 미꾸라지 *hamp*의 5'-flanking 영역 내 존재하는 다양한 전사조절인자들을 예측하였다. TATA box는 개시코돈을 기점으로 -228 bp 영역에 TATAAA의 염기서열으로 확인되었고, CAAT box는 -182, -699 및 -732 bp으로 분석되었다. 기능적 분석은 수행하지 않았지만 감염 및 염증반응으로 인한 저산소의 상황에서 세포 신호전달 체계에서 주로 발견되는 것으로 알려져 있는 motif들인 CCAT enhancer binding protein (C/EBP; consensus sequence, TTDNGNAA), interleukin 6 response element binding protein (IL6-REBP; CTGGRAA), interferon regulatory factor 1 (IRF-1; CTTTCTCTTT), interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF-3; GCTTCAGTTT), nuclear factor kappa B (NF-kB; GGRNNYYCC), activating protein 1 (AP-1; TGASTMA), cyclic AMP responsive element binding protein (CREBP; TGACGY), hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1; RCGTG) 과 SMADs (binds to the bone morphogenetic protein responsive elements, BMP-RE; GGCGCC)가 예측되었다. 그리고 중금속 및 기타 독성화합물에 반응하는 metal-responsive element (MRE; TGCRNC)와 xenobiotic response element (XRE; CACGCW)는 각각 2개 씩, 간 조직에서 높은 발현을 나타내는 유전자들에서 흔히 관찰되는 hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3; TRTTKRYTY) 와 liver trans-acting factor Tf-LF1 (YCTTTGACC) 부착 사이트가 각 1개씩 관찰되었다(Fig. 11).

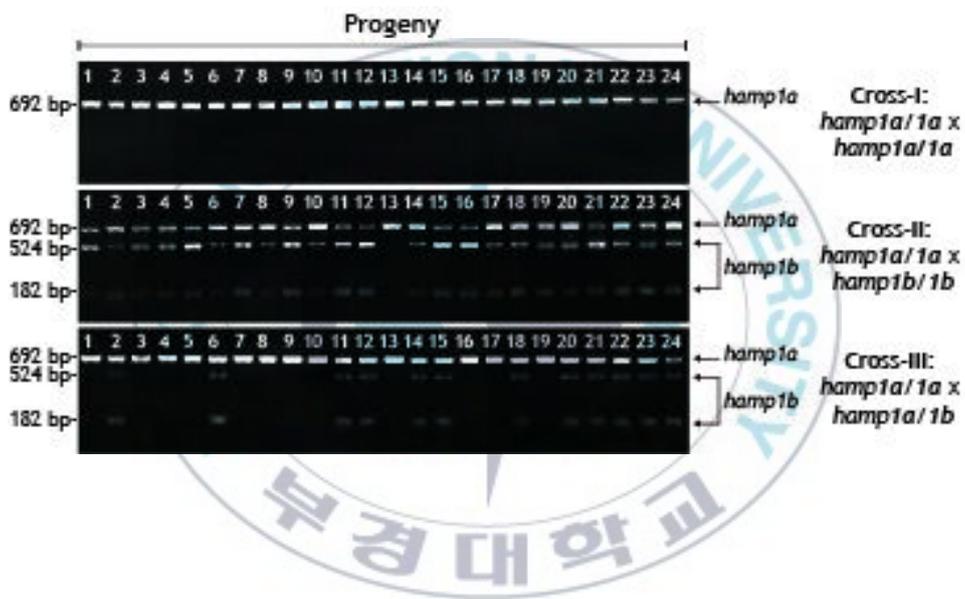


Fig. 9. Mendelian transmission of *hamp* alleles from parents to progeny as confirmed in three independent crosses.

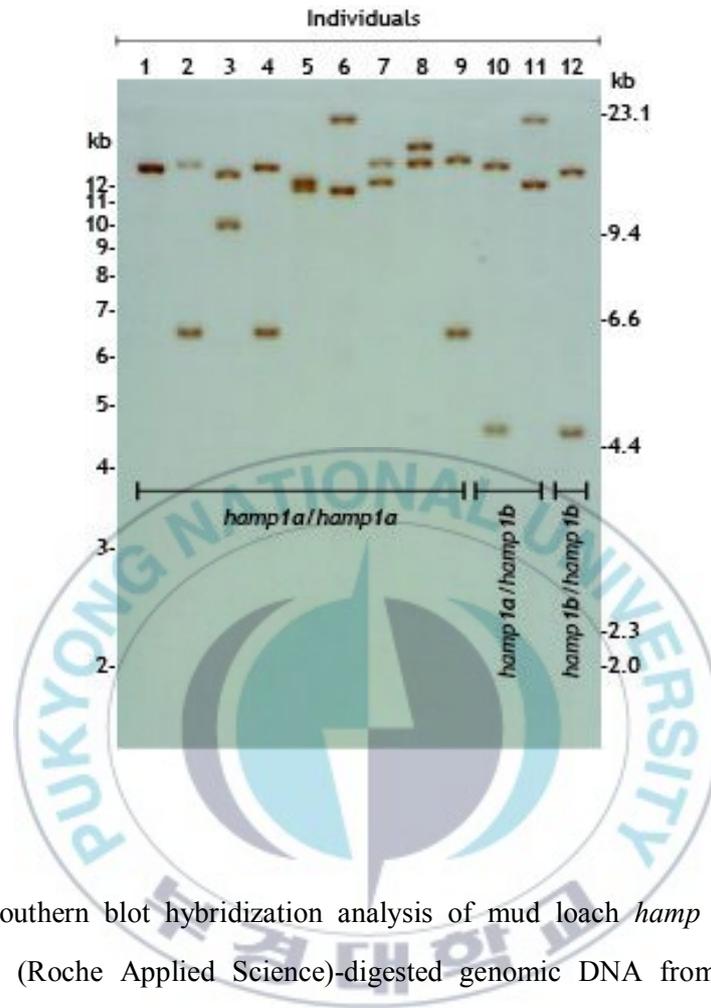


Fig. 10.

Genomic Southern blot hybridization analysis of mud loach *hamp* gene. Five  $\mu$ g of *Dra*II (Roche Applied Science)-digested genomic DNA from each of 12 unrelated individuals was hybridized with a 465-bp digoxigenin-11-dUTP-labeled probe (complementary to a region spanning from exon-I to half of exon-II of *hamp1*). The allelic genotypes of the 12 individuals are also determined by PCR - RFLP as above. Figures at either left or right side are molecular weight sizes in kb as judged based on the 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) or lambda DNA/*Hind*III markers (Promega, Madison, WI, USA).

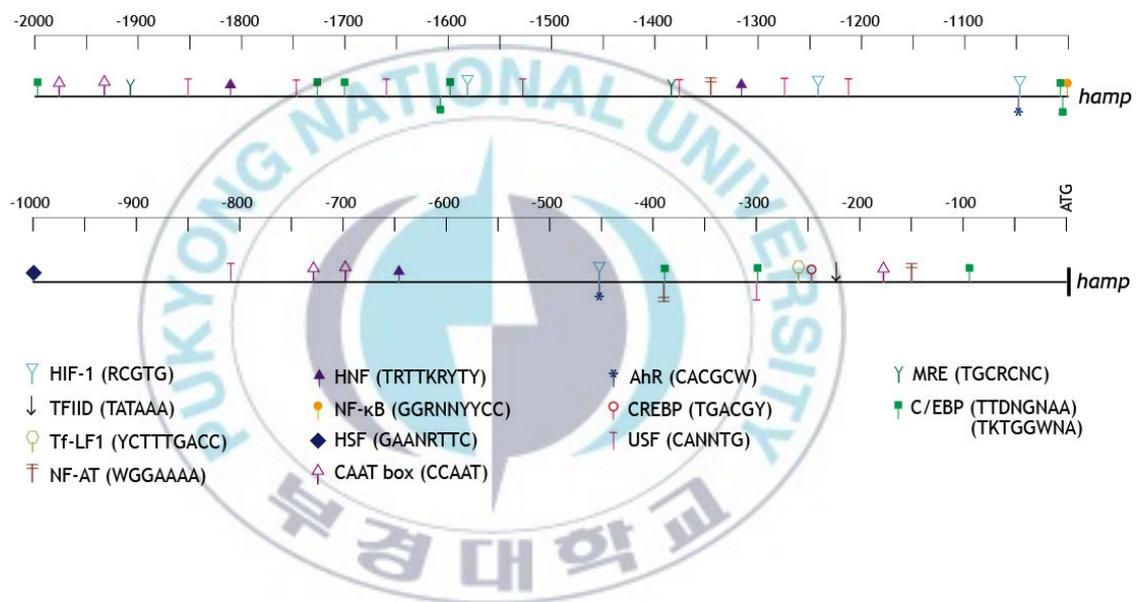


Fig. 11.

Transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach *hamp* gene.

### 3.2.2. LEAP2

*Leap2* 유전자는 *hamp*와 마찬가지로 3개의 exons와 2개의 introns으로 구성되어 있었으며 두 종류의 paralogous isoform에서 동일하였다. *Leap2a*의 exon I, II 및 III의 길이는 각 75, 167 및 37 bp 였고, *leap2b*는 exon I, II 및 III의 길이가 각 72, 164, 및 37 bp 였으며 두 isoform 모두 exon-intron boundary 규칙인 GT-AG 규칙을 잘 따르고 있었다. 그러나 *leap2a*는 *leap2b*에 비하여 non-coding 영역인 intron 1에서 235 bp, 5'-UTR 및 3'-UTR 영역에서 각각 235 bp 및 420 bp가 더 긴 특징을 보였다(Fig. 12). *Leap2a*의 5'-flanking 영역은 염증반응 및 항균 작용 관련 전사조절인자 STAT, HIF-1, AP-1 및 USF가 부착할 수 있는 motif들이 관찰되었고, *leap2b*는 IL6-REBP, NF-AT, HIF-1, AP-1 및 USF 부착 motif들을 나타내었다. *Leap2a*는 5'-flanking 영역 내에 개시코돈을 기점으로 -1699 bp의 위치에 STAT이 1개 관찰되었다. 그리고 HIF-1은 5개, AP-1은 3개 및 USF는 14개가 예측되었다. *Leap2b*는 5'-flanking 영역 내에 IL6-REBP와 NF-AT가 각각 -509 bp 및 -17 bp 위치에서 1개씩 관찰되었고, HIF-1과 AP-1은 각각 1개 및 2개가 예측되었다. 두 isoform 모두 염증반응에 의한 hypoxia에 민감한 반응 가능성을 시사하는 HIF-1이 관찰되었다. 또한 두 isoforms 모두 HNF 및 C/EBP 부착 사이트를 나타냄으로써 간 우월적인 유전자 발현 특징과 잘 일치하였다. 반면 *leap2a*는 *leap2b*와는 달리 중금속 등에 반응하는 MRE copy를 조절부위에 나타내었다(Fig. 13).

### 3.2.3. WAP65

본 연구에서 미꾸라지 *wap65-1*과 *wap65-2*의 genomic 유전자 길이는 9.26 kb와 18.99 kb였다. *Wap65-1* 유전자는 총 10개의 exons (65, 29, 150, 158, 154, 213, 102, 125, 148 및 230 bp)과 9개의 introns (364, 141, 486, 360,

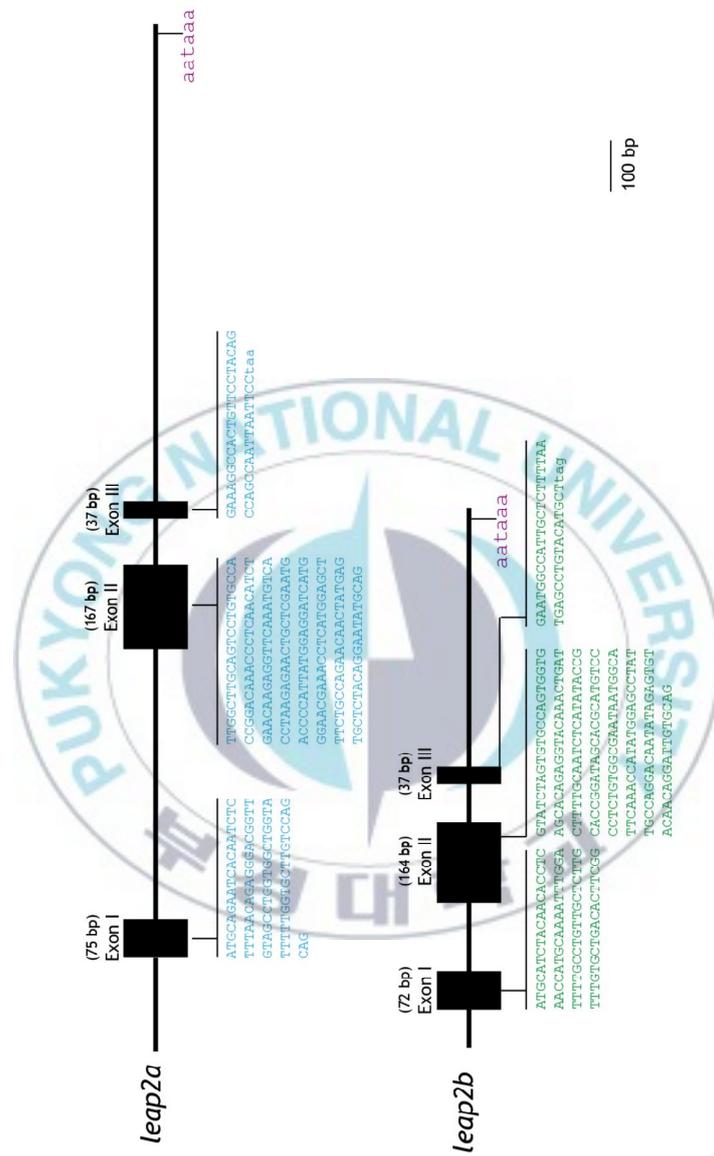


Fig. 12. Gene structure of mud loach *leap2a* and *leap2b* genes. Exons are represented by boxes, and introns are represented by single lines.

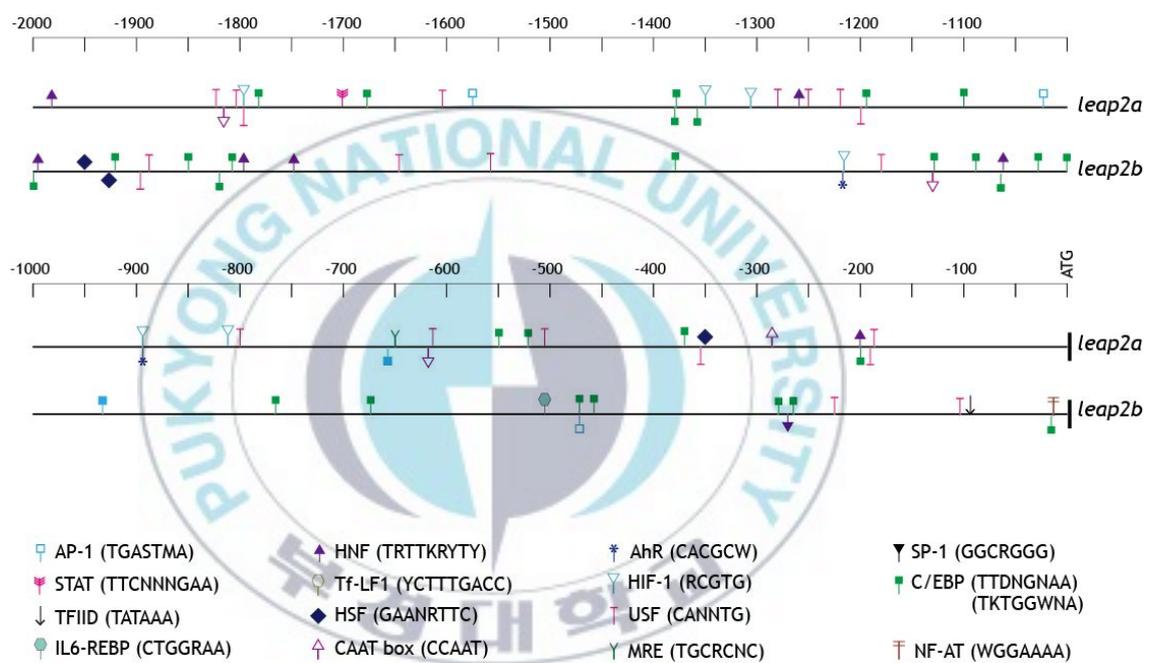


Fig. 13.  
Comparison of transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach *leap2a* and *leap2b* genes.

633, 96, 112, 76 및 99 bp) 그리고 897 bp의 3'-flanking 영역이었다. 그리고 *wap65-2* 유전자 역시 총 10개의 exons (65, 23, 126, 158, 154, 216, 93, 131, 148 및 227 bp)과 9개 introns (463, 4746, 102, 95, 4958, 118, 429, 145 및 3056 bp) 그리고 193 bp의 3'-flanking 영역으로 구성되어 있었다. 두 *wap65* isoforms 모두 exon-intron boundary 규칙인 GT-AG 규칙을 각 boundary 영역에서 잘 따르고 있었다. *Wap65* isoform은 길이 측면에서 큰 차이를 나타내었다. *Wap65-1*의 개시코돈으로부터 종결코돈까지의 길이는 3.74 kb인 반면 *wap65-2*는 15.45 kb 였다. 이 둘의 아미노산 coding 영역만의 길이를 비교해 본 결과 *wap65-1*이 1.37 kb, *wap65-2*가 1.34 kb로서 coding 영역에 비해 상대적으로 intron 길이에서 많은 차이를 나타내었다. 특히 *wap65-2*의 intron 2, 5 및 9 길이가 4.75 kb, 4.96 kb 및 3.06 kb 였으며, *wap65-1*의 intron 2, 5 및 9 길이가 141 bp, 633 bp 및 99 bp이기 때문에 두 isoform 간 큰 길이 차이의 원인이 되었다(Fig. 14). 개시코돈으로부터 2 kb의 5'-flanking 영역을 대상으로 전사조절 인자 분포 특징을 조사하였다. *Wap65-1*은 *wap65-2*에서는 발견되지 않는 AP-1과 Oct-1이 관찰되었고, C/EBP의 분포 수 또한 *wap65-2*에 비하여 많은 것으로 조사되었다. 반면에 *wap65-2*는 *wap65-1*에서 관찰되지 않은 NF-kB가 개시코돈으로부터 -160 bp 및 1920 bp 지점에 있었고, CREBP motif 또한 *wap65-2*에서만 확인되었다. 그리고 USF는 *wap65-1*에서 2개와 *wap65-2*에서 3개가 예측되었으며 HNF는 각 isoform 별로 1개씩 확인되었다. 인간 hemopexin의 5'-flanking 영역의 전사조절인자와 미꾸라지 *wap65* isoform의 전사조절인자 비교 결과 NF-kB와 CREBP는 인간 hemopexin과 미꾸라지 *wap65-2*의 5'-flanking 영역에서만 관찰된 반면 Oct-1은 인간 hemopexin과 *wap65-2*에는 없는 *wap65-1*에서만 예측되었다(Fig. 15).

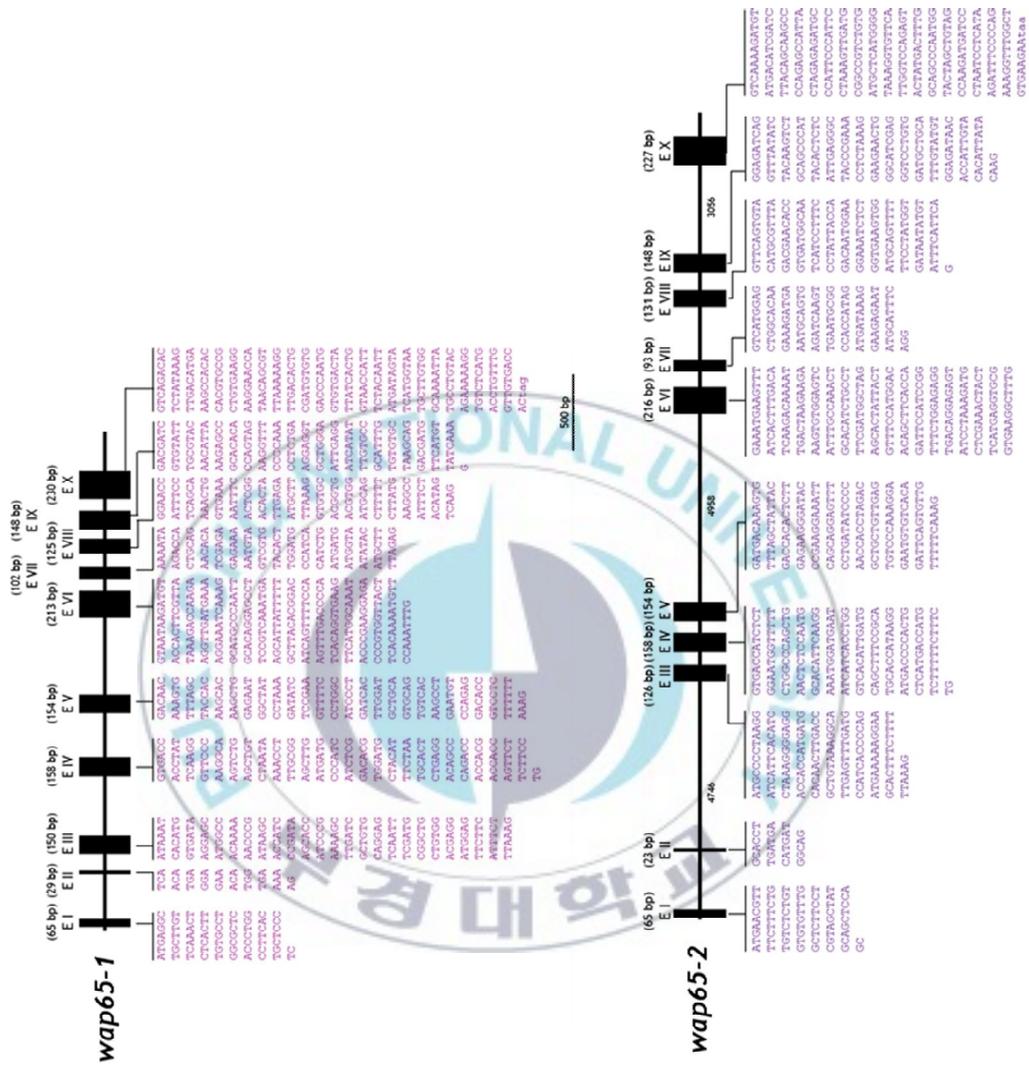


Fig. 14. Gene structure of mud loach *wap65-1* and *wap65-2* genes. Exons are represented by boxes, and introns are represented by single lines.

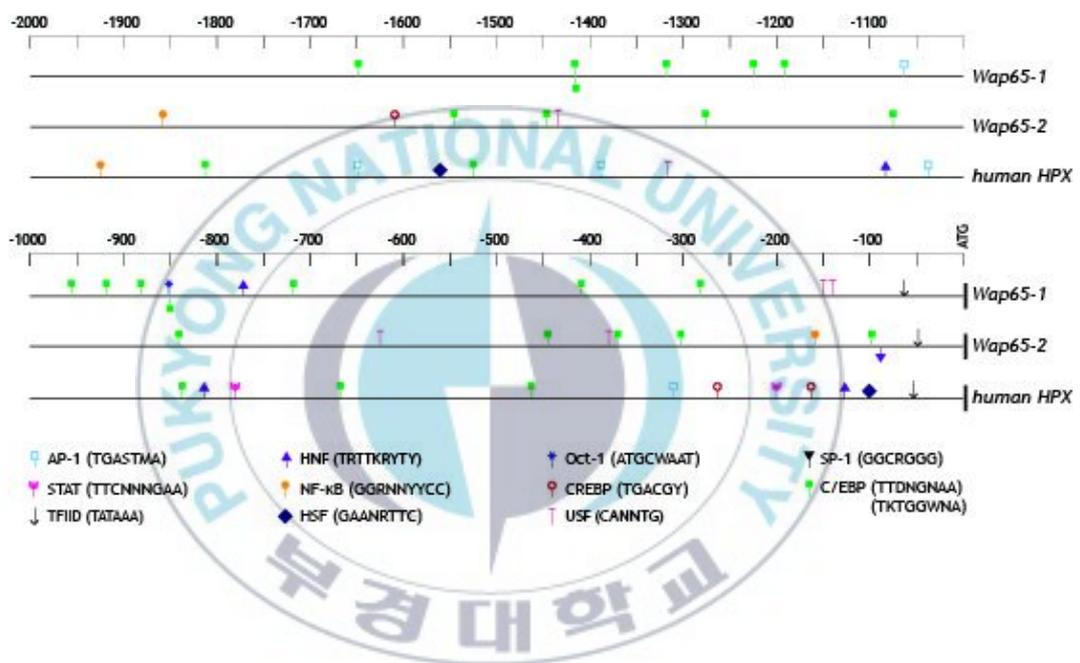


Fig. 15.

Comparison of transcription factor binding motifs in the regulatory regions of mud loach *wap65-1*, *wap65-2* genes and human *HPX* gene. The 2-kb 5'-upstream region from ATG initiation codon of each *wap65* isoform was bioinformatically assessed based on TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

### 3.3. 항균 단백질 유전자 mRNA의 성체 조직 내 발현 분포 양상

미꾸라지 *hamp*는 간 조직에서 가장 높은 mRNA 발현 수준을 나타내었고 그 발현 수준은 *hamp* mRNA를 발현하는 다른 조직들에 비해서 현저히 높았다. 간 조직이외에 근육에서 다음으로 높은 발현을 나타내었고, 그 외 정소와 비장 조직의 순서로 높은 발현이 관찰되었다. 그리고 나머지 조직에서는 *hamp* mRNA 발현이 매우 저조하였다(Fig. 16).

*Leap2*의 경우 두 isoforms 모두 *hamp*와 마찬가지로 간 조직에서 가장 높은 발현을 나타내었으나 다른 조직들에서는 두 isoforms간 발현 분포와 수준에서 차이가 관찰되었다. *Leap2a*는 간 조직 다음으로 난소에서 높은 발현이 관찰되었고, 그 발현양은 간 조직과 유사하였다. 그 다음으로 높은 발현을 나타낸 조직은 장, 표피 및 근육 조직으로서 세 조직에서의 발현양은 서로 유사하였다. 이 세 조직들에 비하여 정소에서 발현이 관찰되었고, 그 외 조직들에서는 *leap2a* mRNA 수준이 매우 낮거나 검출되지 않았다. *Leap2b*는 *leap2a*에 비해서 상대적으로 간에 훨씬 집중된 발현 패턴을 보였다. 간 이외에는 근육 및 비장에서 약한 mRNA 발현이 확인되었으나 그 외 조직에서는 *leap2b*의 발현은 관찰되지 않았다. *Leap2b*의 간 조직 발현은 *leap2a*보다 현저하게 높았다(Fig. 17).

*Wap65* isoforms의 조직 별 RT-PCR 결과 두 isoforms 모두 간 조직에서 가장 높은 발현을 나타내었고, 다른 조직에서도 다양한 발현 양상을 나타내었다. 미꾸라지 *wap65-1*의 발현 순위는 간을 제외하고 비장, 장, 근육 및 신장 순으로 발현율이 높았고, 그 외의 조직, 눈, 아가미 및 생식소 등의 조직에서는 거의 발현이 관찰되지 않았다. 그리고 *wap65-2*는 간을 제외하면 장, 비장 및 근육 순으로 발현율이 높았으며 그 외 조직은 발현이 거의

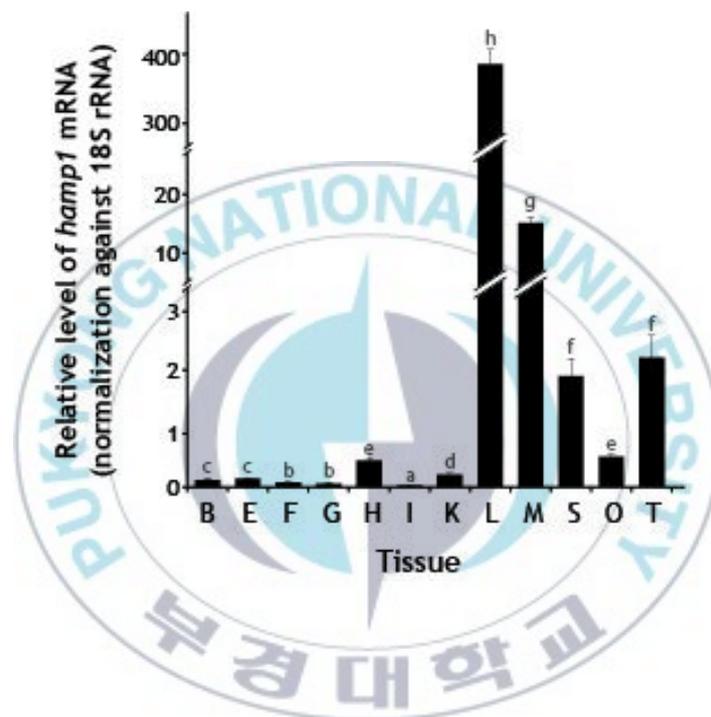


Fig. 16.

Tissue distribution and basal expression level of mud loach *hamp* transcripts, as judged by real-time RT-PCR assay. Tissues were obtained from eight healthy individuals ( $18.5 \pm 3.5$  g body weight) and total RNA was purified using the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendation. Abbreviations for tissues are brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M), spleen (S), ovary (O) and testis (T).



Fig. 17.

Tissue expression of mud loach *leap2a* and *leap2b* genes. *Leap2a* and *leap2b* transcripts in liver (L), ovary (O), muscle (M), intestine (I), skin (Sk), testis (T), kidney(K), heart (H), spleen (S) of mud loach are detected by semi-quantitative RT-PCR.

관찰되지 않았다(Fig. 18, 19). 간 조직에서의 두 isoform들 간 mRNA 발현 정도는 *wap65-1*이 *wap65-2*보다 약 4배 정도 높았다.

### 3.4. 발생단계별 항균 단백질 유전자의 발현 양상

미꾸라지 *hamp* mRNA 발현은 발생과정 중 수정 후 6시간(gastrulation)까지 관찰되지 않았으나 8시간(post gastrulation)째에 발현이 처음 관찰되어 12시간(optic vesicles)째까지 증가하였다. 그리고 16시간(3-4 myotomes)째부터 발현이 감소하여 mRNA 발현이 극히 낮은 상태가 유지되었다. 부화 직후 미세한 증가가 다시 관찰되었고, 부화 후 1일에서 2일까지 발현이 크게 증가하는 패턴을 보였다(Fig. 20).

*Leap2* mRNA 발현은 *leap2a*와 *leap2b* isoform간 서로 다른 다른 발현양상을 나타내었다. *Leap2a*는 수정 후 12시간(optic vesicles)까지 발현이 관찰되지 않다가 16 시간(3-4 myotomes)째부터 발현이 시작하여 부화 후 2일째까지 점차적으로 증가하는 경향이였다. 그러나 *leap2b*는 수정 후 6시간(gastrulation)까지 관찰되지 않았고, 8시간(post gastrulation)째에 발현이 관찰되다가 다시 부화 직후까지 발현이 점차 감소하였다. 부화 이후 1일 후부터 2일까지 발현이 급격히 증가하는 패턴을 보임으로써 발현시점과 발현의 증감 경향이 *hamp*와 하였다.(Fig. 20).

미꾸라지 *wap65*의 두 isoform도 발생단계에 따라 다른 발현 경향이 관찰되었다. *Wap65-1*은 수정 후 4 시간(blastula)째에 미세한 발현이 처음 관찰되었고, 수정 후 6시간에서 20 시간(formation of eye lens)째까지 발현이 증가하였다. 20 시간 째 발생단계 가운데 최고 발현이 관찰되었고, 24 시간(specialization of brain)째부터 발현이 감소하다고 부화 직후 발현이 미세하게 증가하였다. 반면에 *wap65-2*는 수정 후부터 20 시간째까지 저조한 발

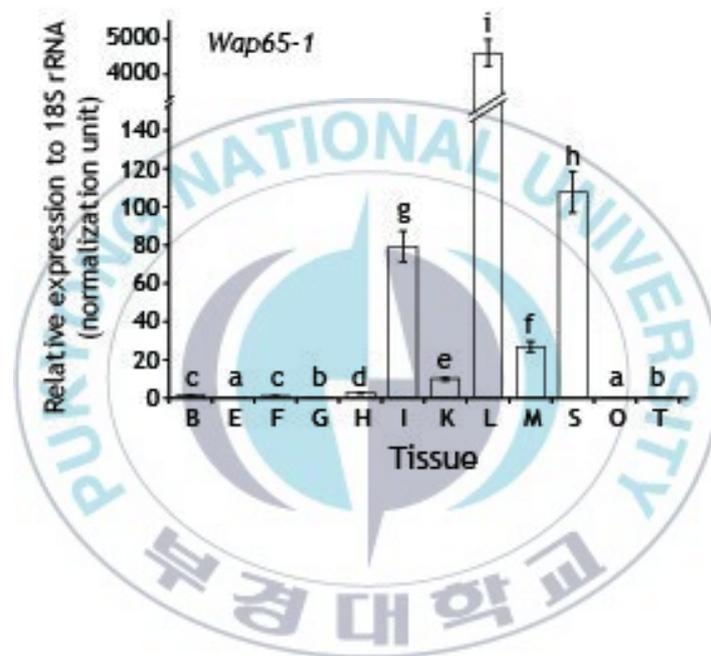


Fig. 18.

Distribution of mud loach *wap65-1* transcripts in adult tissues. Abbreviations for tissue types are brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M), spleen (S), ovary (O) and testis (T). Means  $\pm$  SD with the same letters are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

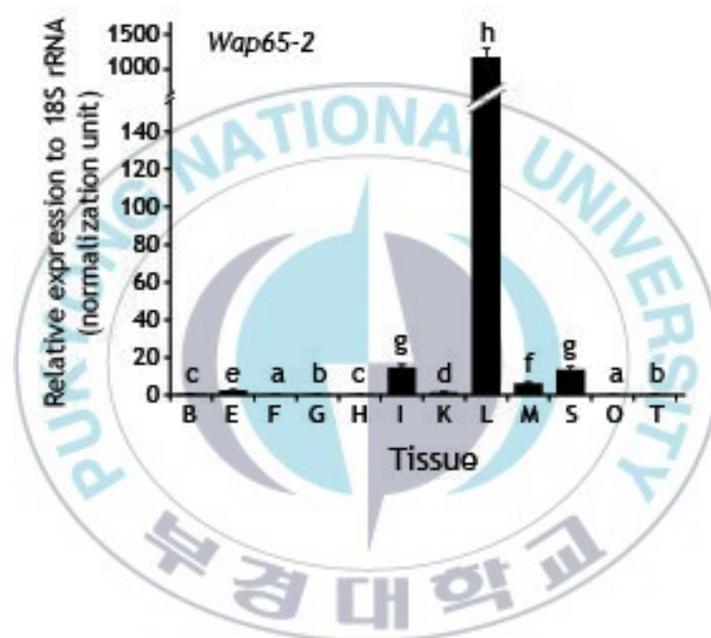


Fig. 19.

Distribution of mud loach *wap65-2* transcripts in adult tissues. Abbreviations for tissue types are brain (B), eye (E), fin (F), gill (G), heart (H), intestine (I), kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M), spleen (S), ovary (O) and testis (T). Means  $\pm$  SD with the same letters are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

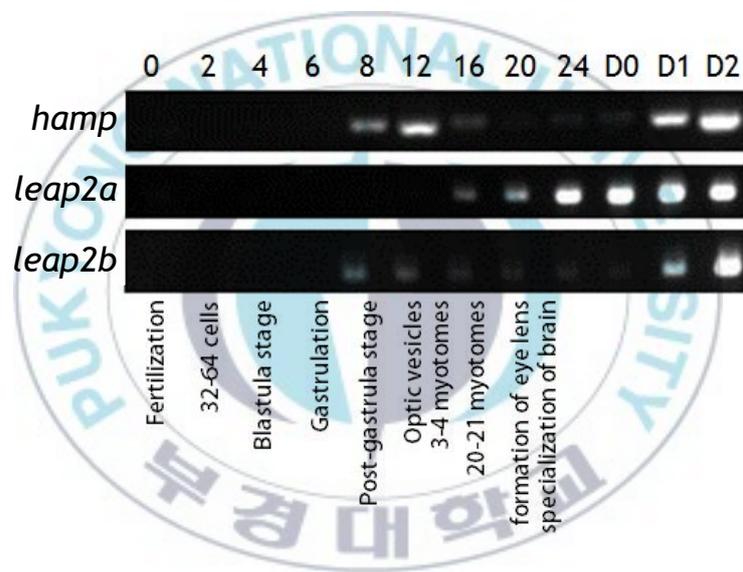


Fig. 20.

Quantitative expression profile of mud loach *hamp*, *leap2a* and *leap2b* genes at different early developmental stages.

현을 나타내다가 24시간 쯤 발현이 급격하게 증가하였고, 부화 직후 *wap65-1*보다 높은 발현을 나타내었다(Fig. 21).

### 3.5. 실험자극에 대한 전사발현 특징

#### 3.5.1. HAMP

미꾸라지 *hamp*는 면역 자극원인 LPS 처리 후 분석한 모든 조직에서 발현이 증가한 반면 polyI:C 처리에 대하여는 분석한 조직들에서 차등 발현 반응이 나타나지 않았다. LPS 처리 결과 대조군에 비하여 비장 3.9배, 신장 3.6 배, 간 2.4배 및 장 1.9배의 발현이 증가하여 비장과 신장 조직이 LPS에 대한 반응 민감도가 가장 높았고, 장에서의 발현이 가장 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 LPS 결과와는 달리 poly I:C 처리군에서는 특이적으로 발현이 증가 또는 감소하는 경향을 나타내는 조직이 관찰되지 않았다(Fig. 22).

미꾸라지의 *E. tarda* 농도 별 주사 후 감염된 미꾸라지 내 *hamp* 유전자의 발현 경향 결과 장, 신장, 간 조직 모두 주사한 농도가 높은 그룹에서 발현이 높았다. 그러나 비장 조직의 경우  $1 \times 10^6$  cells/g BW으로 주사한 그룹에서의 발현이 가장 높은 농도로 주사한 그룹( $5 \times 10^6$  cells/g BW)보다 발현이 높았다. 미꾸라지 *hamp*의 조직별 발현은  $5 \times 10^6$  cells/g BW 농도를 주사한 그룹에서의 발현량을 기준으로 신장, 장, 비장 및 간 조직 순으로 발현은 경향이었고, 신장에서의 발현량이 다른 조직보다 현저하게 높았으며 장 및 비장 조직은 주사 농도 별 최고 발현량은 유사한 것으로 나타났다(Fig. 23).

박테리아 종류에 따른 그람 음성균(*V. anguillarum*, *V. vulnificus* 및 *V. harveyi*), 그람 양성균(*L. garviae*, *S. iniae* 및 *S. parauberis*)의 감염 시 미꾸라지 *hamp*의 신장, 간 및 비장 조직 별 RT-PCR 분석 결과 세균의 종류에

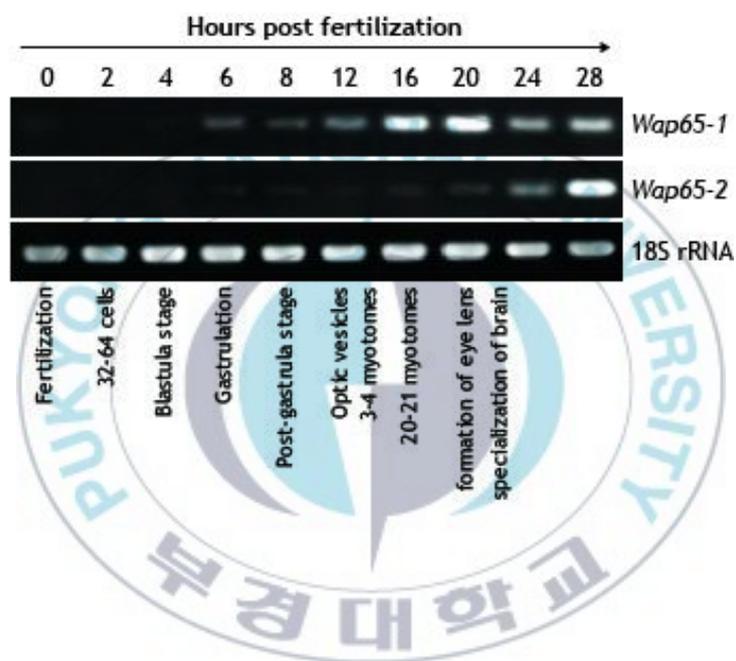


Fig. 21.

Representative RT-PCR gels to show the mRNA expression of mud loach *wap65-1* and *wap65-2* isoforms along with an 18S rRNA control during embryonic development.

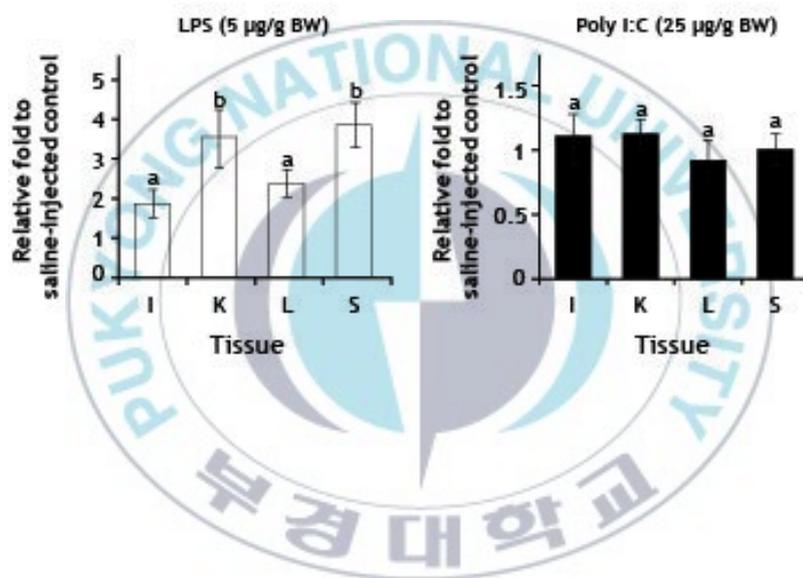


Fig. 22.

Differential expression of mud loach *hamp* gene in response to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay. Altered mRNA expression of *hamp* in response to LPS (0 or 5 mg/g BW) and poly(I:C) (0 or 25 mg/g BW) challenges. Abbreviations for tissues are intestine (I), kidney (K), liver (L) and spleen (S).

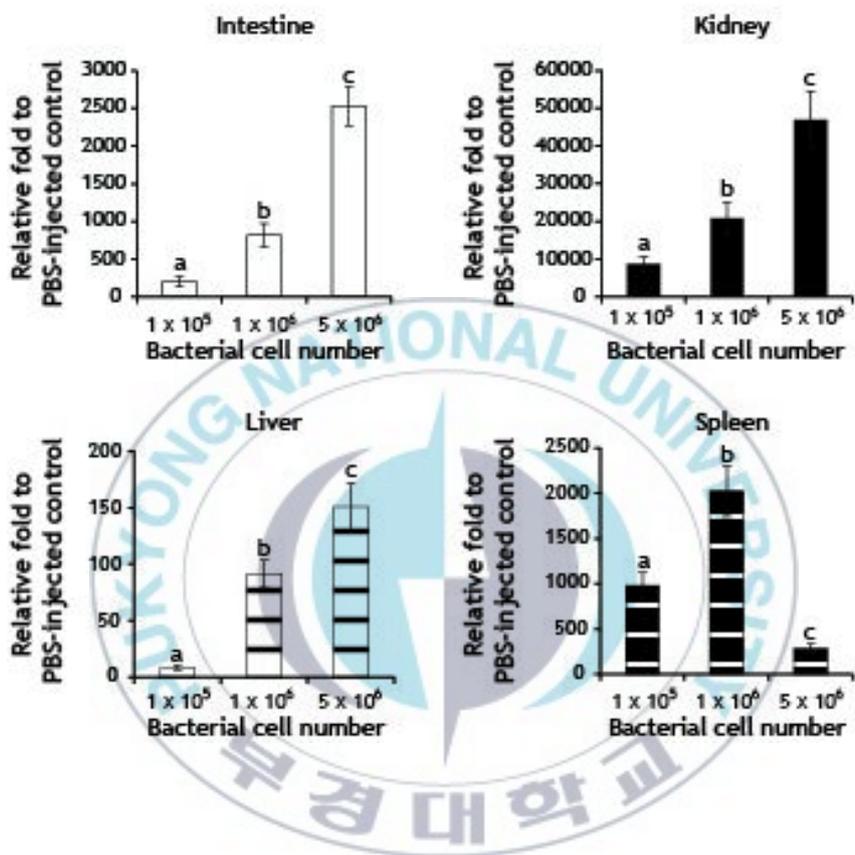


Fig. 23.

Differential expression of mud loach *hamp* gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay. Differential modulation of *hamp* resulting from the *E. tarda* challenge using an intraperitoneal injection of bacterial suspension [0 (control),  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  or  $5 \times 10^6$  cells in PBS per g BW].

따라 발현 경향이 달랐다. 분석 조직 모두 그람 양성균의 감염보다 그람 음성균의 감염에 더욱 민감한 반응을 나타내었다. 미꾸라지 간 조직에서 *hamp* mRNA는 그람 음성균의 감염으로 인하여 대조군보다 약 102~212배 발현이 증가하였고, 그람 양성균의 감염으로 26~59배 발현이 증가하였다. 신장 및 비장 조직에서 그람 음성균(*Vibrio* 종)감염에 대한 *hamp* 발현이 그람 양성균의 감염보다 각각 35 및 50 배 높은 발현이 나타났다. 그리고 추가적으로 급성 감염 및 염증 발현 지표자로서 interleukin 1 발현을 함께 분석한 결과 *hamp*의 발현 경향과 마찬가지로 그람 음성균 감염 그룹에서 높은 발현이 나타났으며 간, 신장 및 비장 조직 모두에서 그 경향은 유사하였다(Fig. 24, 25).

미꾸라지의 철분 과부화에 따른 *hamp* 유전자의 발현 분석 결과 세 종류의 철분 농도에 상관없이 간 조직에서 대조군보다 약 100배 높은 발현을 나타내었다. 그리고 장 조직은 철분 농도가 높아짐에 따라 *hamp* 발현도 같이 증가하는 경향을 나타내었고, 철분 농도가 가장 높은 그룹(1.0 mg/g BW)에서 대조군보다 123배 높은 발현을 나타내었다. 신장 조직은 철분 농도 두 개 구간(0.5 및 1.0 mg/g BW)에서 약 28배의 발현 증가를 나타내었고, 비장 조직은 철분 농도 1.0 mg/g BW 그룹보다 0.5 mg/g BW 그룹에서 높은 발현이 관찰되었고, 대조군보다 32 배 높은 발현 경향을 나타내었다(Fig. 26).

미꾸라지 *hamp* 유전자는 중금속(구리)노출에 따른 다양한 조직별 유도 발현이 관찰되었다. 구리 노출 군의 경우 신장에서 대조군에 비하여 약 30 배, 비장에서 약 14배, 간에서 약 6배, 그리고 장 조직에서 약 2배의 발현 증가를 나타내었다(Fig. 27).

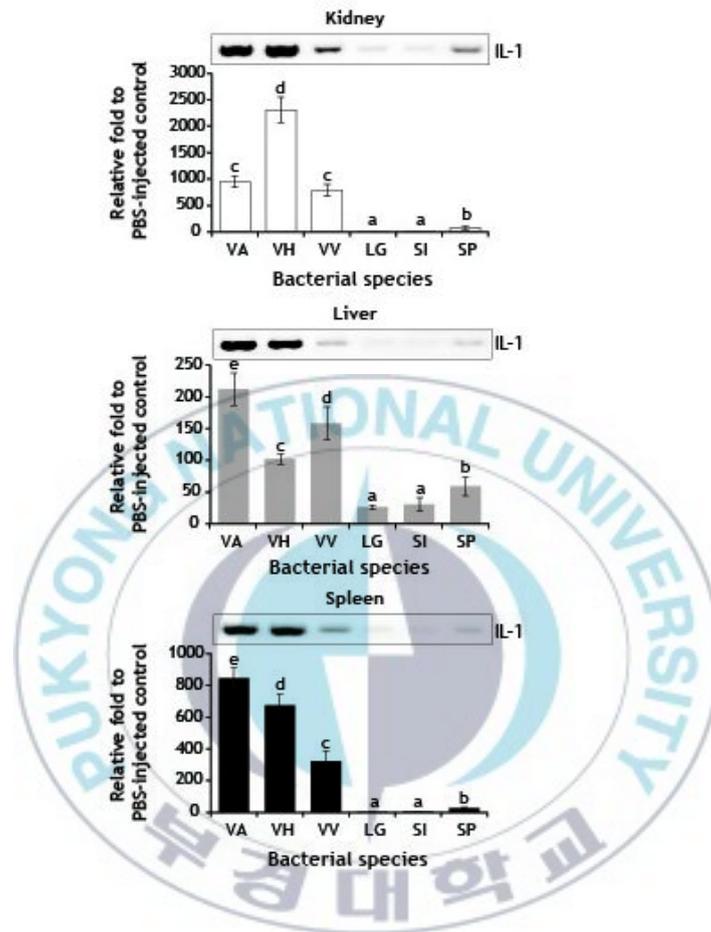


Fig. 24.

Differential expression of mud loach *hamp* gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay. Transcriptional response of *hamp* to experimental challenges with six different bacterial species (each  $1 \times 10^6$  cells/g BW). Bacterial species are *Vibrio anguillarum* (VA), *V. harveyi* (VH), *V. vulnificus* (VV), *Lactococcus garvieae* (LG), *Streptococcus iniae* (SI) and *S. parauberis* (SP).

```

AAACTCTGGTGC CGGAGTGGTGGAAATCCATAATTTGATGGCTAAAACCTCTGAAAGGTGGCA
ATGACCAGTACAAAGTTTCGATTCACTCTGTCGACTTACATGTCACCAACTCCCACCAAGC
MM IL1b 1F

CTGGTTCGCAACCCGTTTGCTGGGCATTTCTAAGAGCAACCTCTACCTTGCTTGACCA
AAGCGGAGCAGTCTAAACCTCCTACCTTGGTCTTAAAGGAGATCAATGACACTCTCGACA
CCATTGTTGATGGTGGTATGCCAATGGATACGATCACCTCCTCTTCTACAGGACAGAGTCCG
MM IL1b 1R

GAGTGTCTAACACACTTTTGAATCGGTCAAATTTCCCGGATGGTTTATTAAAG

CA1 NKLINNEDLHLKAVTLSAGNIQYKVRFSMSTYLS-SSPQNKGPVCLAISNSNLYLACTES
CA2 NKQS-DPLHLKAVTLSAGTMQYKVFSMSTYIS-SATPKDAQVCLEISNSNLYLACTQS
DR LVRSSGSPRLLGVTLRDGNSDSKVRFNLSMYASPSATFNASQVCLAISSKSNLYLACTES
CI LVRSGGSPHLQAVTLRAGSSDLKVRFSMSTYASPSAPATSAQVCLGISSKSNLYLACCPA
MM LVRSGGSPYLMARTLKGGNDQYKVRFSLSTYMSPTPTKPGSQVCLGISSKSNLYLACTKA
      *  **  *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CA1 DGSS-PALILKVSGPLNTIKVGDPNGYDSLLFERKEIGTAYNTFBSVKYPGWYI
CA2 DGSS-PALILKVKGPLNTIKTIDPNGNDSLLFERKEIGTAYNTFBSVKFPGWFI
DR DGSS-PHLVSKVTETLNTIKAG--DQHDNLLFERKEIGVANNTFBSVKYPGWFI
CI BGSTSPHLVLKEISGSLETIKAGDPNGYDQLLFERKEIGSSINTFBSVKCPGWFI
MM BQSKPPTLVLKEINDTLDTIVDGDANGYDHLLFYRTBSGVSNNTFBSVKFPGWFI
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CA1 Carassius auratus interleukin-1 beta 1 (CAC80551)
CA2 Carassius auratus interleukin-1 beta 2 (CAC80552)
DR Danio rerio interleukin-1 beta (NP_998009)
CI Ctenopharyngodon idella interleukin-1 beta (ABU88422)
MM Misgurnus mizolepis (present study)

```

Fig. 25.

Partial nucleotide sequence of mud loach interleukin-1 beta (IL-1b) cDNA. Binding sites of two oligonucleotide primers (ML IL1b 1F/1R) used for RT-PCR amplification of a 210-bp IL-1b internal segment are indicated by arrows. A partial alignment of mud loach IL-1b amino acid sequence along with its orthologues from representative cypriniform species is also provided. In the alignment, the amino acid residues same with mud loach IL-1b are indicated with bold letters. The conserved residues in all the five cypriniform IL-1b sequences are indicated by asterisks.

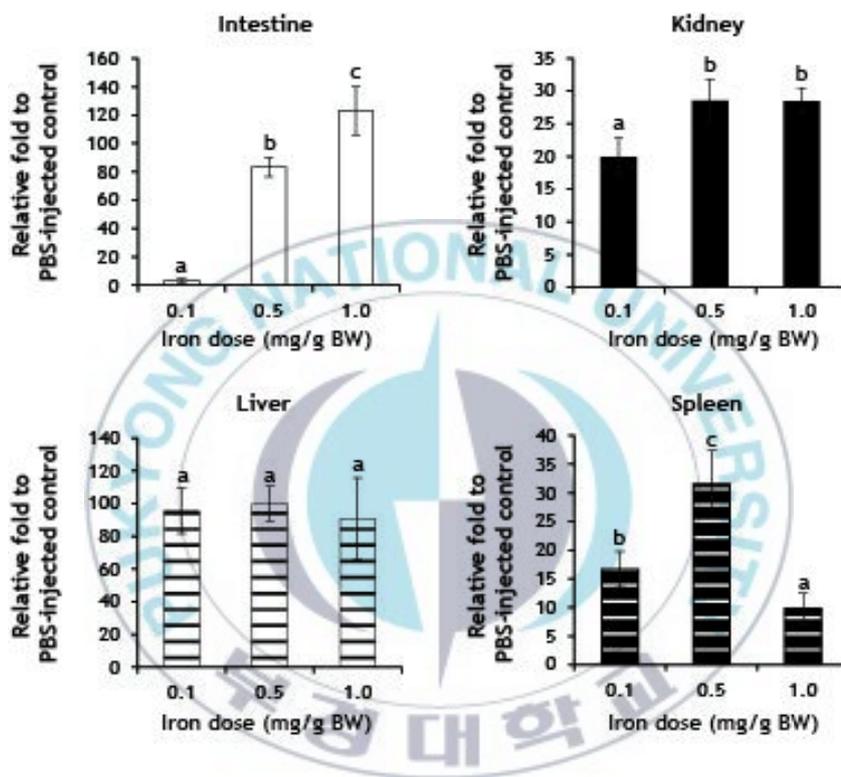


Fig. 26.

Differential modulation of mud loach *hamp* expression in responsive to iron overload as assessed by real-time RT-PCR. For iron overload, iron dextran was injected into mud loach at one of four dose levels 0 (control) 0.1, 0.5 and 1.0 mg/g BW, and the *hamp* transcripts were assessed at 24 h post injection.

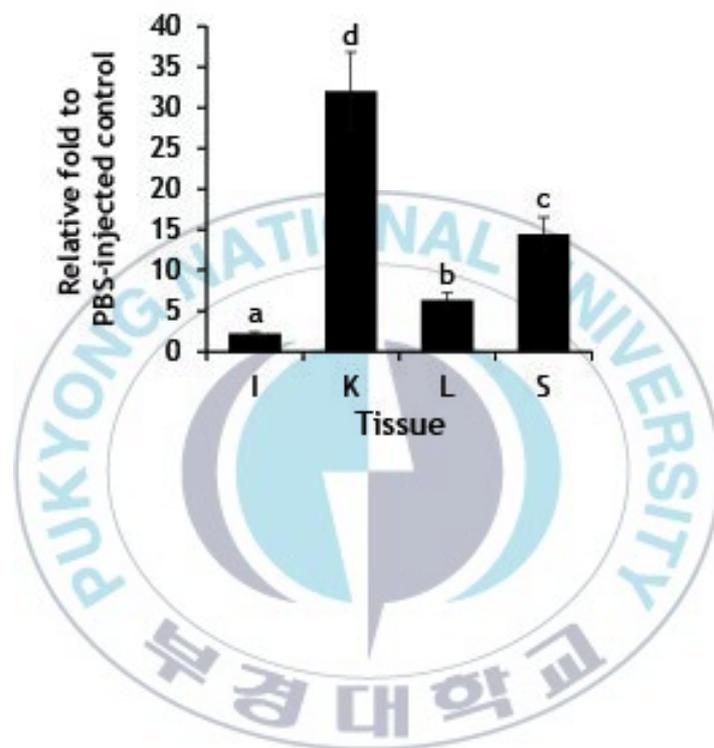


Fig. 27.

Differential modulation of mud loach *hamp* expression in response to copper exposure. For copper (Cu)-exposure, mud loach individuals were immersed in tap water containing Cu at 0 (control) or 5  $\mu$ M of nominal concentration. Forty-eight hours after immersion, intestine (I), kidney (K), liver (L) and spleen (S) were obtained from the six-randomly-chosen individuals in each group for gene expression assay.

### 3.5.2. LEAP2

LPS 자극에 따른 미꾸라지 *leap2a* mRNA 발현을 분석한 결과 간 조직에서는 거의 변화가 없었던 반면 신장과 비장 조직에서는 오히려 발현이 감소하는 경향을 나타내었다. *Leap2b*는 신장, 간 및 비장 모두 발현이 감소하는 경향으로 확인되었다. 그리고 polyI:C 자극원에 대하여 *leap2a* 및 *leap2b*의 발현 반응은 대부분 LPS 처리 시와 유사한 경향을 나타내었으나 *leap2*의 경우 특히 간 조직에서 약 5배 발현 증가를 보여 차이가 있었다(Fig. 28, 29).

*E. tarda* 감염처리 후 간 조직에서의 *leap2a* 발현은 *E. tarda* 주사 후 6시간, 12시간 및 24시간 쯤 발현이 대조군에 비하여 약 13배, 15배 및 10배로 증가하였고, 24시간부터 발현이 감소하였으며 48시간 쯤 발현이 더욱 감소하여 192시간 쯤에는 대조군과 유의적인 통계차가 관찰되지 않았다. 신장 조직은 간 조직과 유사한 발현 경향을 보인 반면 발현 양은 6시간, 12시간 및 24시간 쯤 대조군에 비하여 약 4배, 6배 및 2배의 증가를 보였다. 비장 조직은 간 조직과 신장 조직에서의 *leap2a* 발현과는 다른 경향인 6시간에 최고 발현이 나타났으며 주사 후 12시간부터 발현이 감소하였다. *Leap2b*의 발현 경향은 *leap2a*와 유사한 것으로 관찰되었으나 발현양은 *leap2a*보다 낮았다. *Leap2b*는 *E. tarda* 주사 후 12시간 쯤에 간 조직에서 대조군에 비하여 3.5배 높은 발현양을 나타내다 24시간 쯤부터 발현이 감소하기 시작하여 48시간에 발현이 보다 감소하였다. *E. tarda* 주사 후 24시간까지 신장 조직과 비장 조직에서의 *leap2b* 발현 경향이 간 조직에서의 발현 경향과 유사하였으나 발현양은 약 2배 더 낮았다(Fig. 30).

그람 음성균과 그람 양성균의 감염에 따른 *leap2* isoform 별 발현 양상을 조사한 결과, 발현 조직 및 균 종류에 따라 유의적인 차이가 나타났다. 간 조직에서 *leap2a*의 경우 그람 음성균인 *V. vulnificus* 및 *V. harveyi*의 감염

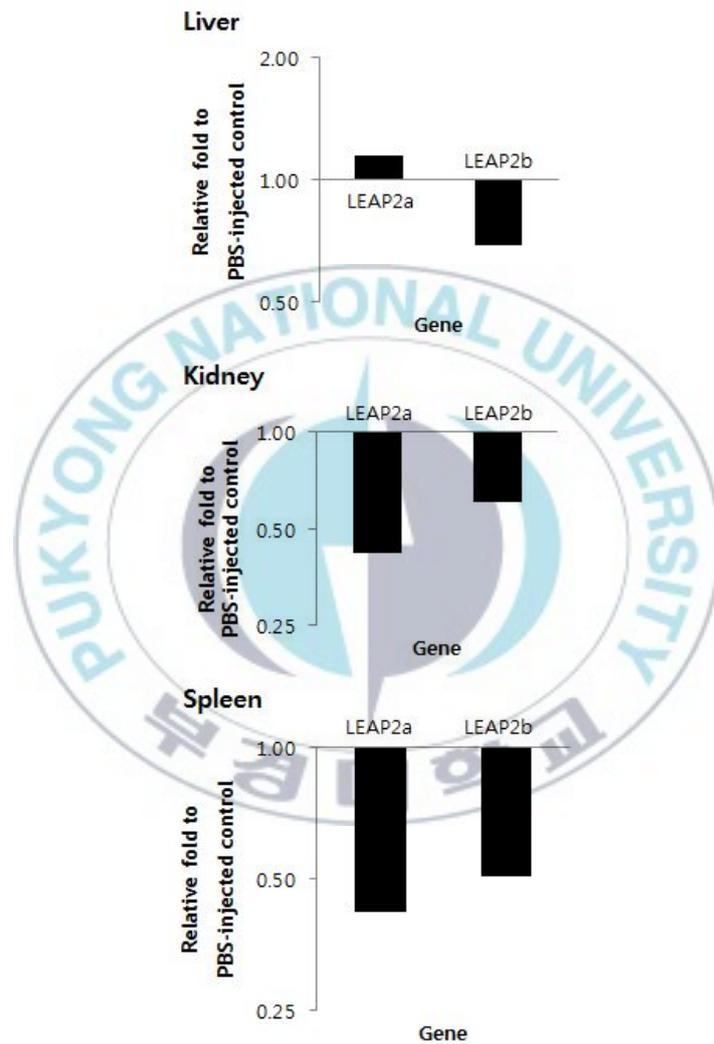


Fig. 28.

Quantitative RT-PCR for *leap2a* and *leap2b* expression in response to LPS.

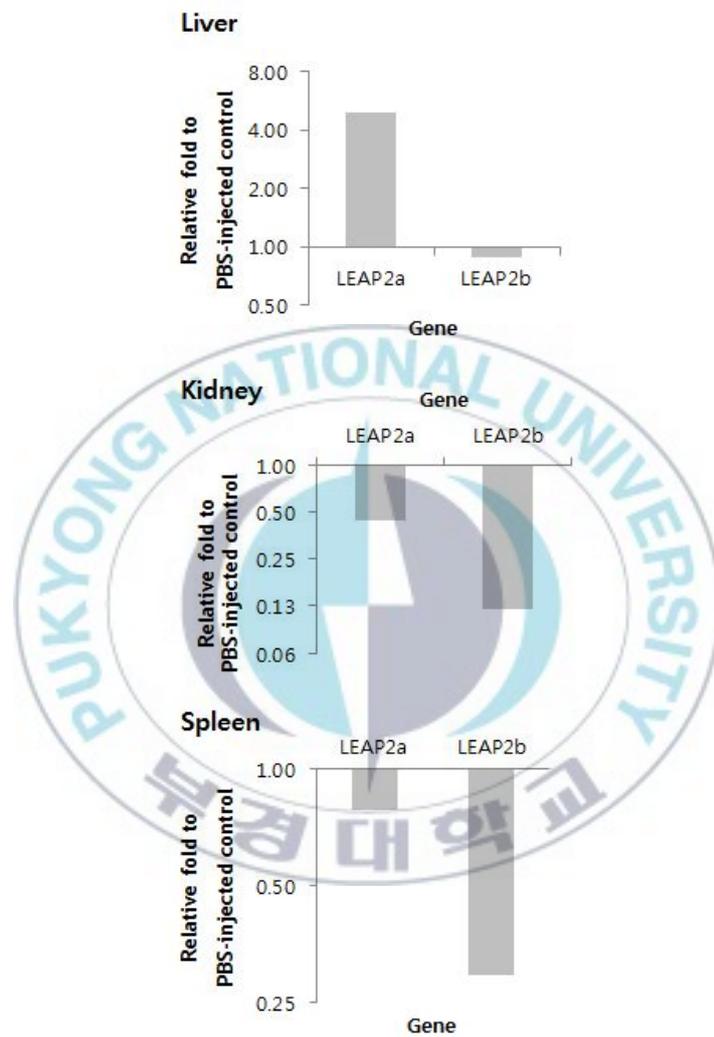


Fig. 29.

Quantitative RT-PCR for *leap2a* and *leap2b* expression in response to polyI:C.

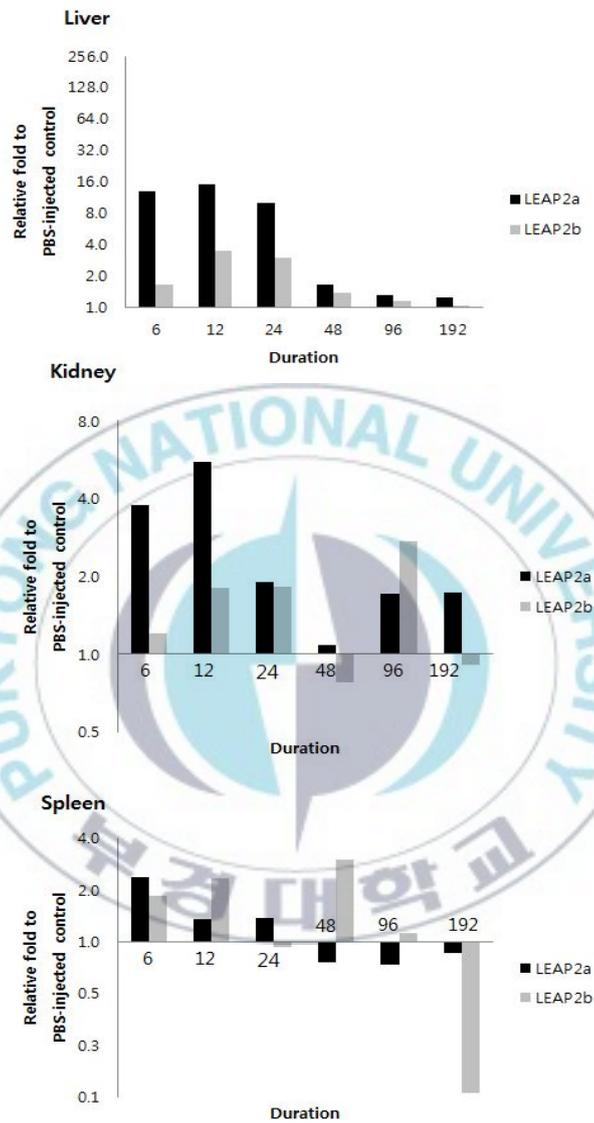


Fig. 30.

The relative expression of *leap2a* and *leap2b* in mud loach after intraperitoneal injection with *E. tarda*.

후 대조군에 비해 7.3배 및 4.5배 발현이 증가하였고, 그람 양성균인 *L. garviae* 및 *S. iniae* 감염 후 대조군에 비해 1.9배 및 2.7 배 증가하였다. 신장에서 *leap2a*의 발현은 그람 양성균 *S. iniae*이 약 2배의 발현 증가를 나타낸 것을 제외하고 다른 그람 양성균 및 음성균에 따른 발현이 감소하였다. 비장의 *leap2a* 발현은 그람 음성균 두 종에 대하여 약 4 배 및 16 배 증가하였고, 그람 양성균 두 종에 대하여 약 1.5배 및 4 배 증가하여 간에서의 *leap2a* 발현 경향과 같이 그람 음성균에 대한 발현이 조금 더 민감하였다 (Fig. 31). 반면 *leap2b*는 간에서 그람 음성균인 *V. vulnificus* 의 감염 후 약 2배 증가를 보였고, *V. harveyi*에 대한 발현 변화는 없었으며 그람양성균인 *L. garviae* 및 *S. iniae* 감염 시 대조군에 비하여 4.3 및 2.5 배 발현이 증가하였다. 신장에서의 *leap2b* 발현은 간에서와는 달리 그람 음성균 감염에 대해 발현이 더욱 높았고, 그람 양성균 *L. garviae*의 감염에 대해 발현이 감소하였으며 *S. iniae*의 감염에 대한 발현은 약 3배 증가하였다. 비장에서는 신장과의 발현 패턴이 유사하였다. 그람 음성균 두 종의 감염에 대한 유도 발현이 나타났고, 그람 양성균 *L. garviae*의 감염에 대한 발현은 감소하였으며 그람 양성균 *S. iniae*의 감염 시 발현이 증가하였다(Fig. 32).

미꾸라지의 중금속 노출에 따른 *leap2a*와 *leap2b*의 발현 양상 또한 조직에 따라 다양한 발현이 경향이 관찰되었다. *Leap2a*의 경우 간에서는 구리 처리군에서만 약간의 발현이 증가하였고, 나머지 중금속에서는 발현이 감소하였거나 유의적인 변동이 관찰되지 않았다. 신장에서는 구리 처리군과 아연 처리군에서만 발현이 감소하는 경향을 나타내었고, 다른 중금속 처리에서는 약 2배 내외의 증가 경향을 보였다. 비장에서는 카드뮴 및 구리 처리군에서 약 2배의 증가가 관찰되었고, 나머지 처리군에서는 유의적으로 큰 변동이 없었다. 간 조직에서 *leap2b*는 크롬을 처리한 그룹에서 약 2배 발현 증가가 관찰되었고, 대부분 처리군에서는 발현이 감소하였다. 신장 조

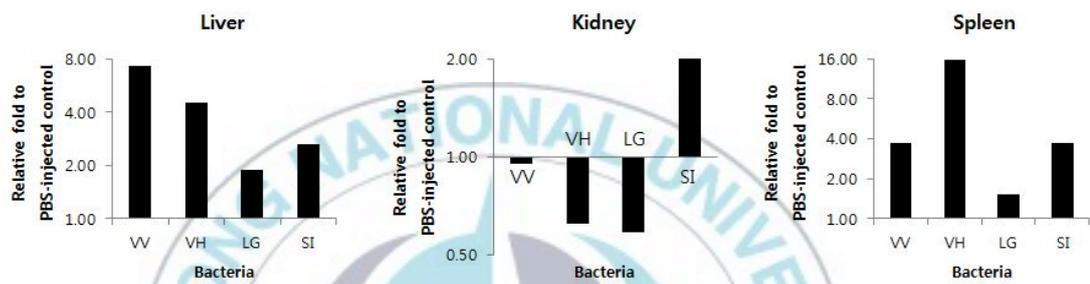


Fig. 31. Differential expression of mud loach *leap2a* gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay.

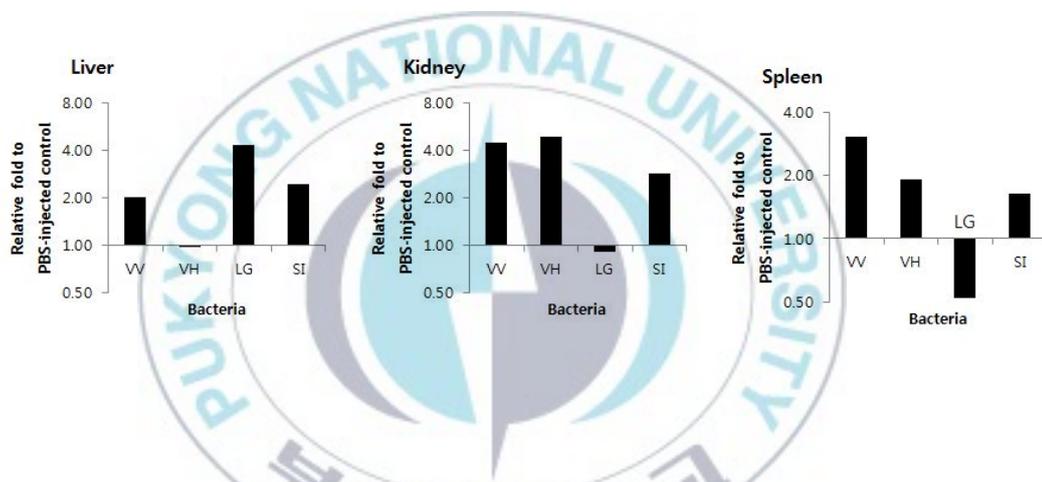


Fig. 32. Differential expression of mud loach *leap2b* gene in responsive to different immune stimulations, as determined by real-time RT-PCR assay.

직에서는 구리 및 망간 처리군에서 *leap2b* 발현이 약 7~ 8배 증가하였고, 카드뮴 처리군에서 큰 발현의 감소가 관찰되었다. 비장 조직은 중금속 처리에 대한 *leap2b*의 반응이 가장 민감하였고, 이에 철, 니켈 및 아연 처리군을 제외한 나머지 처리군에서 발현이 증가하였고, 특히 구리와 크롬은 각 120배 및 50배의 높은 유도 발현을 유발하였다(Fig. 33).

철분 과부화에 따른 *leap2* isoforms의 발현 양상은 다음과 같다. 간 조직에서는 *leap2a*가 모든 구간에서 발현이 증가하였지만 0.1 mg/g 처리군에서 발현 약 4배 증가하여 가장 높은 발현을 나타내었다. 신장 조직에서의 *leap2a*는 0.5 mg/g 처리군에서 매우 낮은 발현 증가가 관찰되었고, 나머지 구간 0.1 mg/g과 1.0 mg/g 에서는 발현이 감소하였다. 비장에서는 *leap2a*가 전 구간에서 발현 약 11배, 21배 및 15 배 증가하여 0.5 mg/g 처리군에서 가장 높은 발현이 관찰되었고, 나머지 그룹은 비슷한 발현으로 확인되었다. 반면 *leap2b*의 발현 양상은 *leap2a*와 다소 차이가 있었는데 간 조직에서 0.1 mg/g 및 0.5 mg/g 처리군에서는 약한 유도발현이 관찰되었으나 최고 농도인 1.0 mg/g 처리군에서는 약간의 발현 억제가 나타났다. 신장 조직에서는 3개 농도 처리군 모두 대조군보다 6배 발현이 증가하는 유사한 경향을 나타내었다. 비장 조직에서는 처리군에서 *leap2b* 발현이 감소하는 경향을 보였지만 농도의존적인 패턴을 보이지 않았고, 0.5 mg/g 농도에서는 대조군과 유의적 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 34).

### 3.5.3. WAP65

미꾸라지 *wap65* isoforms은 온도 자극에 따라 다른 발현 경향을 나타내었다. 간 조직에서의 *wap65-1*은 온도가 상승함에 따라 발현이 급격히 증가하였고, 반면에 온도가 하강함에 따라 발현이 감소하였다. 즉, 25°C에서 32°C로 온도 상승에 따라 *wap65-1*의 유전자 발현은 2 배 증가하였고, 11°C

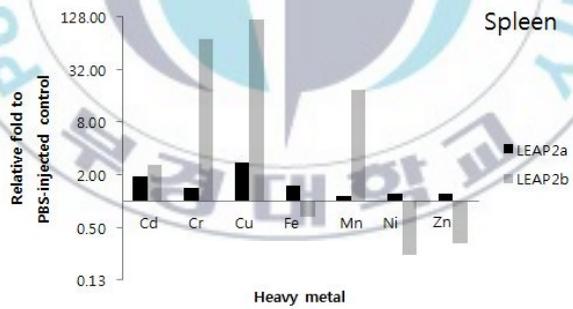
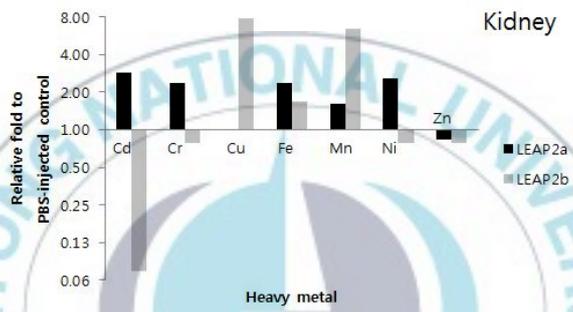
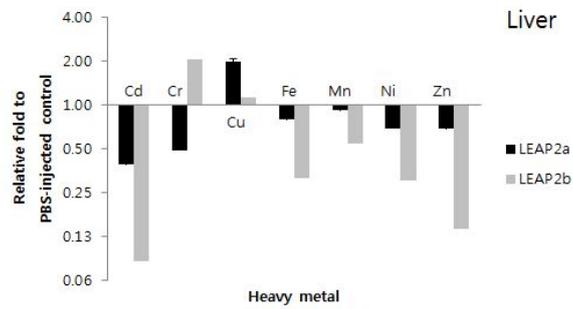


Fig. 33.

Differential modulation of *leap2* isoforms expression in responsive to experimental exposure to cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mg), nickel (Ni) and zinc (Zn) by immersion.

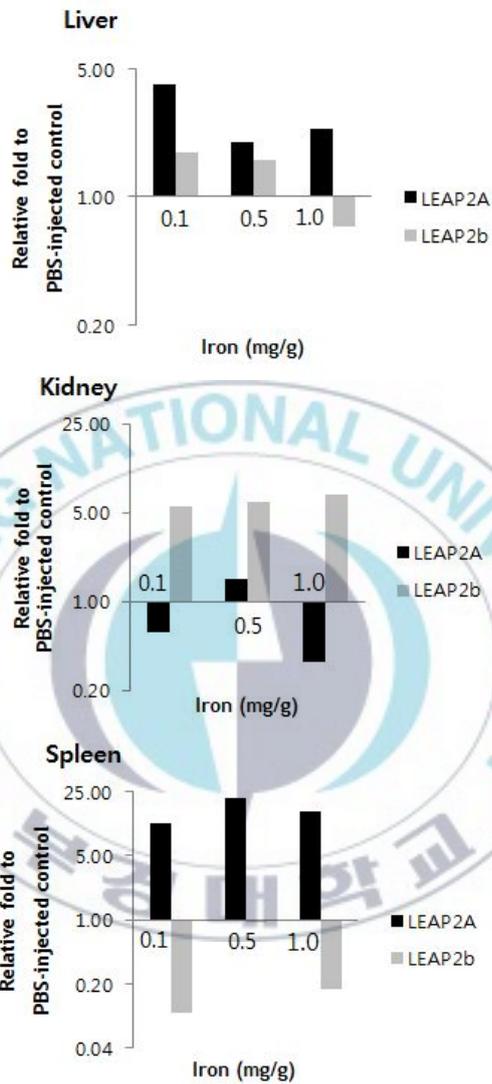


Fig. 34.

Quantitative analysis of the mud loach *leap2a* and *leap2b* genes expression during iron overload. Mud loach were intraperitoneal injected with 0.1, 0.5 and 1.0 mg FeCl<sub>2</sub>/g BW, respectively. Control group was injected with PBS.

로 하강함에 따라 유전자 발현이 2배가 감소하였다. 반대로 *wap65-2*의 경우 온도가 상승함에 따라 유전자 발현이 감소하였고, 온도가 하강함에 따라 유전자 발현은 대조군과 유의적인 차이가 없었다(Fig. 35).

미꾸라지 *wap65* 유전자의 면역 자극에 대한 발현 양상을 확인하고자 LPS를 처리하였다. *Wap65-1*은 LPS 처리에 대하여 유전자 발현에 약간 감소하는 경향을 나타낸 반면 *wap65-2*는 대조군에 비하여 약 6배의 발현 증가를 나타내었다(Fig. 36). 그람 음성 병원균인 *E. tarda* 감염 실험 결과 앞서 수행한 LPS와 마찬가지로 *wap65-1*은 발현이 감소하였다. *E. tarda* 주사 후 24 시간 쯤 대조군보다 발현이 4.6 배 감소하였고, 48 시간 쯤 발현은 3 배 감소하였으며 96 시간 쯤 발현은 2.5 배 감소하였다. 이와 반대로 *wap65-2*는 *E. tarda* 주사 후 유전자 발현이 15배가 증가하였고, 24, 48 및 96 시간 주사 후 모든 구간에서 유사한 발현 증가율을 나타내었다(Fig. 37).

미꾸라지의 중금속 처리에 대한 발현 반응을 조사하기 위해 cadmium (Cd), copper (Cu) 및 nickel (Ni) 처리 후 *wap65* isoforms의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. *Wap65-2*는 중금속 처리 세 그룹에 대하여 발현이 증가(3 배, 2배 및 1.5배)하는 양상이 관찰되었지만 *wap65-1*은 Cu 및 Ni에 대하여 낮은 발현(1.4배)이 관찰되었고, Cd 처리에 대하여 대조군과 유의적인 차이가 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 38).

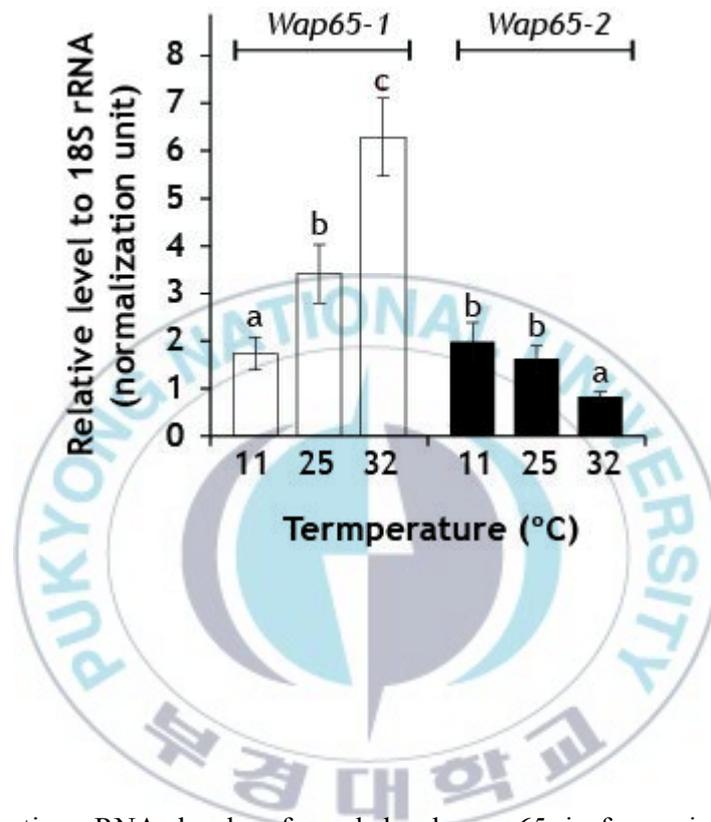


Fig. 35.

Altered hepatic mRNA levels of mud loach *wap65* isoforms in response to thermal change. Fish that had been preacclimated at 25°C were exposed to either heat treatment (to 32°C), cold treatment (to 11°C), or constant temperature (maintained at 25°C). Means  $\pm$  SD with the same letters within a given isoform are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

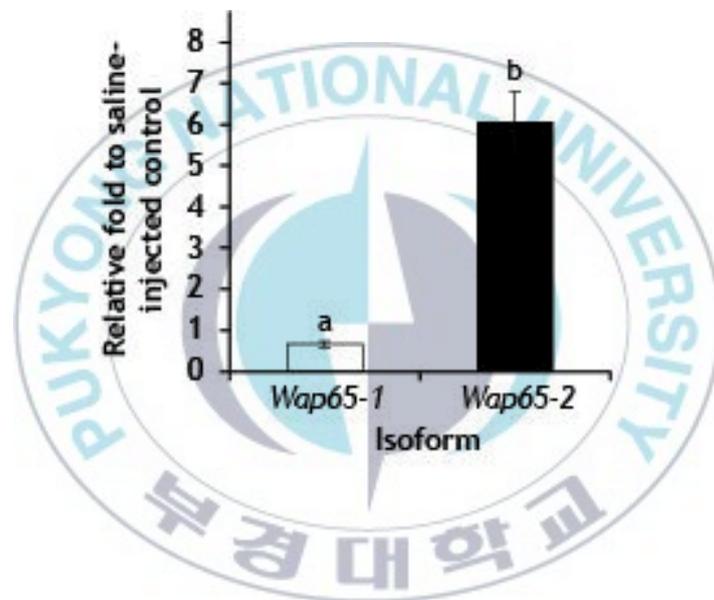


Fig. 36.

Differential modulation of mud loach *wap65* isoforms by lipopolysaccharide (LPS) injection. The expression patterns of *wap65-1* and *wap65-2* isoforms in response to LPS were significantly different from each other ( $P < 0.05$ ).

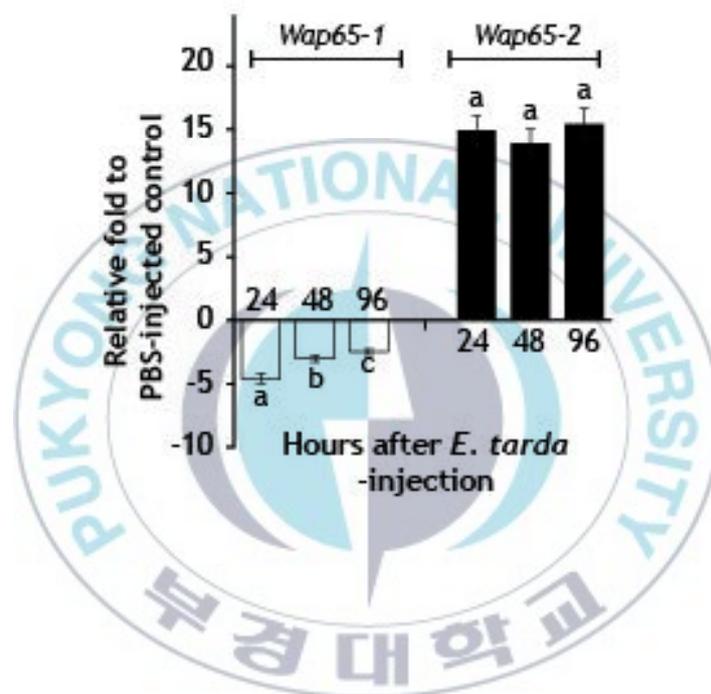


Fig. 37.

Differential modulation of mud loach *wap65* isoforms by *E. tarda* challenge. In (B), means  $\pm$  SD with the same letters within a given isoform are not significantly different based on ANOVA followed by Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ . Each mean in this figure was significantly different from that of corresponding control based on Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

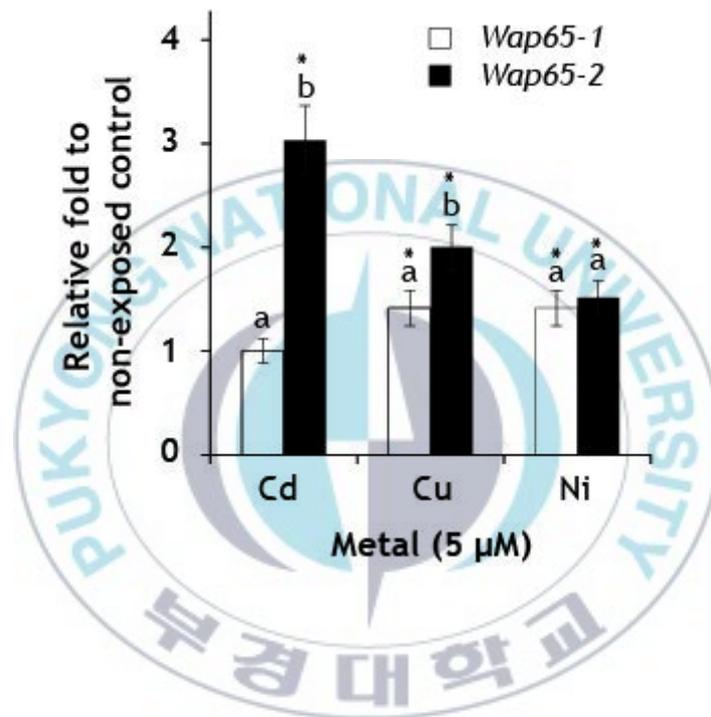


Fig. 38.

Differential expression of mud loach *wap65* isoforms in response to experimental exposure to cadmium (Cd), copper (Cu) and nickel (Ni) by immersion. Means  $\pm$  SD with the same letters within a metal group are not significantly different based on Student's t-test at  $P = 0.05$ . Significantly different means compared to that of non-exposed control group were indicated by asterisks based on Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## IV. 고찰

본 연구는 미꾸라지를 모델로 이용하여 어류 간에서 발현하는 항균 작용 유전자들(*hamp*, *leap2* 및 *wap65*)의 유전자 구조와 발현 조절 특징을 규명하고자 하였다.

미꾸라지 *hamp*는 91개의 아미노산을 암호화하고 있으며, 발현 transcripts 들 간 2개 위치에서 아미노산 치환을 유발하지 않는 염기변이가 관찰되었다. 잉어목 어류들과 ORF 영역을 alignment하여 비교한 결과 2개 변이 영역들 중 첫 번째 지점(개시코돈으로부터 +144 bp)에서의 변이는 미꾸라지에서만 관찰된 반면, 두 번째 지점(개시코돈으로부터 +147 bp)은 잉어목 내 중간 변이가 관찰되는 영역이었다. 즉, 해당 영역에서 제브라피쉬만 thymine이었고, 나머지 어류들은 모두 adenine으로 관찰되었다(alignment not shown). 공개된 유전자 데이터베이스의 검색 및 분석을 통해서 미꾸라지 외에도 종 내 *hamp* mRNA서열의 변이가 4종(잉어, 제브라피쉬, 백련어 및 대두어)에서 검출되었는데 이 중 2종(잉어 및 백련어)에서는 종 내 변이 서열들 간 그룹화 시킬 수 있는 뚜렷한 패턴이 관찰되지 않았으나 나머지 2종(제브라피쉬 및 대두어)에서는 종 내 확연히 구분되는 두 개의 그룹화가 가능하였고, 이들 두 그룹은 서로 다른 길이의 HAMP 아미노산이 합성될 수 있는 가능성을 나타내었다. 즉, 개시코돈으로부터 +88 bp 영역에서 +90 bp까지 3개의 염기가 첨가 되는 패턴이었으며 해당 영역의 염기서열은 CAG (Gln; Q)이었다. 이와 같이 mRNA 염기가 재조립되는 alternative splicing 현상은 돌돔 hepcidin 연구에서도 보고된 바 있어(Cho et al., 2009) 추후 미꾸라지 *hamp*의 경우 특정 자극 또는 조직에서의 alternative splicing 현상 분석이 필요할 것으로 사료된다.

미꾸라지 *hamp*의 genomic 유전자 구조는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있었으며 포유류의 hepcidin과는 달리 대부분의 어류들과 마찬가지로 intron 2가 intron 1에 비하여 길었고, 그 가운데 제브라피쉬 *hamp* (Genbank accession number: AY363452)가 가장 긴 길이로 나타났다(Shike et al., 2004). 미꾸라지 *hamp* mRNA에서 발견된 염기변이가 genomic 유전자 내 exon 2 영역에서도 동일하게 관찰되었는데 이는 southern blot과 PCR-RFLP 분석을 통해 멘델유전방식을 따르는 대립유전자의 형태임을 증명하였다. 암컷(1a/1a)과 수컷(1b/1b) 교배로 확보한 자손 개체 가운데 1미가 다른 개체와는 다른 패턴이 전기영동 결과 관찰되었는데 이는 개체 특이적 DNA 변형으로 인한 제한효소 사이트의 변형일 것이라 판단하였다(Fukami et al., 2006). 또한 Southern blot 분석에서 개체 간 다양한 밴드 형태가 관찰되었지만, PCR-RFLP 결과와 비교 시 paralogous isoform 형태의 패턴이라고 판정하기는 어렵고, 그 보다는 개체간 제한효소 절단위치의 다형성에 기인한다고 판단된다.

미꾸라지 *hamp* 5'-flanking 영역에서 면역 및 염증 반응과 관련된 전사조절 인자, CREBP, NF-kB, IL6-REBP 및 NF-AT들이 분포해 있었으나 JAK/STAT pathway에서 주요 역할을 담당하는 signal transducer and activator of transcription (STAT)이 5'-flanking 영역에서 검색되지 않았다(Truksa et al., 2009). 환경 독소의 합성과 면역반응에 중요한 역할을 담당하는 XRE가 예측되었고(Veldhoen and Duarte, 2010), 이러한 motif들의 발견은 최근 포유류와 어류 hepcidin 유전자의 환경 독성 및 중금속 호르몬에 대한 발현 조절과 일치하는 것으로 판단된다(Chen et al., 2008, Wang et al., 2009, Balesaria et al., 2010). 그리고 hepatocyte nuclear factor 3 (HNF-3; TRTTKRYTY)와 liver trans-acting factor Tf-LF1 (YCTTTGACC)이 미꾸라지 hepcidin 프로모터에서 확인된 것은 hepcidin 유전자의 주요 발현 조직이 간

이라는 것과 잘 일치한다(Ochoa et al., 1989, Mendeizon et al., 1990). 또한 MRE는 미꾸라지 *hamp* 프로모터에서 예측된 metal-transcription factor-1 (MTF-1)의 주요 motif이며 metal-coordinating 유전자들의 발현 조절에 중요한 역할을 담당한다는 점을 고려할 때 *hamp* 유전자가 중금속 노출 조건하에서 차등발현 조절될 수 있는 가능성을 보여주었다(Adams et al., 2002, Stoytcheva et al., 2010).

미꾸라지 LEAP2a와 LEAP2b는 93개와 91개의 아미노산을 암호화하고 있으며 2개의 아미노산 차이는 signal peptide 및 propeptide에서 각 1개씩의 차이에 기인한다. Mature peptide는 LEAP2a와 LEAP2b 모두 41개로 동일하였으나 pI와 GRAVY (grand average of hydropathy)값은 차이를 보였다. LEAP2a와 LEAP2b의 mature peptide pI값은 각각 8.88와 6.68 로 LEAP2b가 LEAP2a에 비하여 낮은 pI값을 나타내었다. LEAP2a는 양전하를 띠는 Arg 및 Lys이 총 4개가 있었고, 음전하를 띠는 Glu가 1개가 있는 반면 LEAP2b는 양전하를 띠는 Arg 및 Lys이 총 3개와 음전하를 띠는 Asn 및 Glu가 총 3개가 있어 pI 값이 큰 것으로 나타났다. LEAP2a는 대부분의 어류에서 pI 값이 8.46 이상으로 나타났지만 LEAP2b의 pI 값은 무지개송어 (8.94)를 제외한 미꾸라지와 잉어의 경우 6.68 및 6.79로 낮은 값을 나타내었다. 또한 LEAP2a 및 LEAP2b이 외 isoform인 LEAP2c를 보유한湄公河(Zebra Mbuna), 무지개송어, 대서양 연어 및 부세(large yellow croaker)의 pI 값은 9.2, 9.16, 9.16 및 9.2의 높은 값으로 조사되었다. 그리고 미꾸라지 LEAP2a와 LEAP2b는 모두 hydrophilic 특징을 가지고 있으며 GRAVY 값은 LEAP2a (-0.578)가 LEAP2b (-0.261)보다 낮았다. 이렇게 LEAP2a가 hydrophilic 성질이 더 강한 이유는 hydrophilic 특성을 띠는 아미노산인 Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn 및 Gln의 총 개수가 18개로 LEAP2b의 hydrophilic 특성을 띠는 아미노산 개수인 14개보다 많이 분포되어 있기 때문이다. 동일 어

류 종 내에서 다양한 pI 값에 따른 항균 펩타이드의 항균 활성에 관한 자세한 비교연구는 아직 매우 부족한 상태이지만, 지중해 담치(*Mytilus galloprovincialis*) defensin의 재조합 단백질 사례에서 pI 값이 높은 재조합 단백질 형태가 음전하를 띄는 미생물의 인지질 층과의 결합이 강해지기 때문에 pI 값이 낮은 형태에 비해 보다 높은 항균 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(Romestand et al., 2003). 따라서 이러한 연구결과를 근거로 하여 pI 값이 높은 미꾸라지 LEAP2a의 항균 활성 능력이 LEAP2b보다 높을 것이라 예상되며 앞으로 이를 증명하기 위하여 미꾸라지 LEAP2a와 LEAP2b 재조합 단백질의 항균 기능 실험이 필요한 것으로 판단된다.

미꾸라지 *leap2*의 두 isoform은 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있으며 이는 어류에서 알려진 *leap2* orthologues들과 일치한다(Zhang et al., 2004, Li et al., 2014, Yang et al., 2014). 미꾸라지 *leap2a*와 *leap2b*의 5'-flanking 영역에서 선천성 면역체계의 항균작용 및 염증반응에 관여하는 다양한 전사조절인자들이 예측되었다. *Leap2b* 5'-flanking 영역 내에는 IL-6 RE에 결합하는 IL6-REBP와 IL-2 (Interleukin-2) 프로모터에 결합하여 전사를 촉진하는 NF-AT motif들이 모두 있었다. IL6-REBP는 *A. immaculatus*의 hepcidin 유전자(Masso-Silva et al., 2011), 넙치(*P. olivaceus*)의 신경 내분비 면역 기능을 하는 prepro-vasoactive intestinal peptide (prepro-VIP) 유전자, 항균 펩타이드 유전자인  $\beta$ -defension와 성장호르몬방출호르몬 유전자인 GHRH 등의 5'-flanking에서 보고된 바 있다(Nam et al., 2009, 2010, 2011). 그리고 면역세포의 분화와 면역반응의 조절에 관여하는 NF-AT는 넙치의  $\beta$ -defension 및 GHRH 유전자의 5'-flanking에서 보고된 바 있다(Macian, 2005, Nam et al., 2010, 2011). AP-1과 HIF-1는 미꾸라지 *leap2a*와 *leap2b*의 5'-flanking 영역에 공통적으로 부착할 것으로 예측된 전사조절인자로서 AP-1은 산화성 스트레스 자극에 의해 활성화되고, NF-kB 및 STAT 등의

전사인자들과 상호작용을 하는 특징이 있으며 *A. immaculatus* (Masso-Silva et al., 2011), 돌돔(Cho et al., 2009) 및 *Xenopus* (Hu et al., 2008) *hamp*의 5'-flanking 영역에서 해당 motif들이 예측된 바 있다. HIF-1는 hypoxia의 조건에서 에너지 대사 및 혈관 형성을 조절, 선천성 면역 관여 전사 조절인자로서 포식세포와 각질형성세포에서 병원균에 대한 HIF-1의 반응이 보고된 바 있다(Okumura et al., 2012). *Leap2a*의 5'-flanking 영역에 있는 STAT은 세포막에 존재하는 수용체와 Jak kinase 등에 의해 활성화되는 신호전달인자의 기능과 전사조절인자의 기능을 모두 수행하며 아직까지 다른 종에서 *leap2*의 전사조절인자로서 연구는 미보고된 상태이나 돌돔(Cho et al., 2009), 농어(Barnes et al., 2011) 및 *Xenopus* (Hu et al., 2008)의 *hamp* 5'-flanking에서는 제시된 바 있다. 그리고 *leap2a* 및 *leap2b*의 5'-flanking 영역에서 공통적으로 예측된 USF 사이트는 항균 및 염증 반응을 조절하는 유전자들에서 흔히 관찰되는 motif로서 차벨 메기(Bao et al., 2006), 돌돔(Cho et al., 2009), *A. immaculatus* (Masso-Silva et al., 2011) 및 *Xenopus* (Hu et al., 2008)의 *hamp*에서 보고된 바 있다.

미꾸라지 WAP65는 2개 paralogous isoform이 기능적, 구조적 분화가 이루어져 있는 단백질이다. 인간 hemopexin이 heme-binding pocket 구조를 형성하기 위해 필요한 중요한 몇 가지 요소들 가운데 이화황 결합형성을 만드는 cysteine의 위치와 방향족 잔기들의 위치가 어류 WAP65 isoforms이 동일한 것으로 나타났다(Takahashi et al., 1985, Paoli et al., 1999). 포유류 hemopexin에는 hemopexin과 heme 사이의 heme axial ligand binding을 포함하는 bis-histidyl Fe(III) complex 형태의 2개의 핵심적인 histidine 잔기가 존재하는 것으로 알려져 있다(Paoli et al., 1999). 대부분 어류의 WAP65-2에서는 histidine잔기가 모두 보존되어 있지만 미꾸라지를 위시한 여러 어류(금붕어, 잉어 및 차벨 메기 등)에서 WAP65-1은 둘 중 1개의 histidine 잔기만

을 보전하거나 위치에 차이가 있다(Sarropoulou et al., 2010). 이를 근거로 많은 어종에서 WAP65-2가 WAP65-1에 비하여 포유류의 hemopexin과 더욱 가까운 진화적 거리에 있는 것으로 제안되고 있으며 본 연구에서 분석된 미꾸라지의 WAP65 역시 이에 해당된다고 판단된다.

미꾸라지 *wap65* isoform의 genomic 유전자 구조는 모두 10개의 exon으로 구성되어 있었고, 이는 대부분 다른 어류들의 *wap65*와 동일하였다. 따라서 *wap65* 유전자가 동일한 조상으로부터 분화가 진행되어 왔음을 알 수 있다. 그러나 넙치(Kim et al., 2013)와湄公河魚(Maylandia zebra; zebra mbuna)는 다른 어류들과는 달리 *wap65*의 exon이 9개가 관찰되었고, 넙치 *wap65-1*의 exon 5는 다른 어류들의 exon 5 및 exon 6을 더한 길이와 유사함을 근거로 어류 *wap65* 유전자가 어종 별 진화 과정 중 exon-shuffling을 포함하였을 가능성을 시사한 바 있다(Kim et al., 2013).

미꾸라지 *wap65*의 5'-flanking 영역에 존재하는 AP-1, C/EBP, CREBP, Oct-1 및 USF와 같은 숙주 방어 시스템에 관련된 전사조절인자들은 다양한 생체방어 관련 유전자들의 연구에서 이미 보고된 바 있다(Truksa et al., 2007; Cho et al., 2009; Nam et al., 2011). POU domain인 Oct-1의 경우 신진대사와 스트레스 신호에 대한 다기능 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang and Jin, 2010). *Wap65-2*의 5'-flanking 영역에 포함된 NF- $\kappa$ B는 선천성 면역 시스템에 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Hayden and Ghosh, 2004; Cho et al., 2009) 이를 통하여 *wap65-1*보다 감염에 의한 면역 반응은 *wap65-2*가 많은 기여를 할 것이라 판단된다. 그리고 몇몇 어종에서만 *wap65* 유전자의 cytokine 반응 및 스트레스 반응에 관한 연구가 알려져 있고, 단일 종에서의 *wap65*의 두 isoform에 관한 연구는 거의 알려져 있지 않다(Hirayama et al., 2003; Nakaniwa et al., 2005; Sha et al., 2008). 따라서 다양한 어종에서의 *wap65* isoform의 구조적 및 기능적

연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

미꾸라지 *hamp*는 간 조직에서 특이적으로 높은 경향을 나타내었고, 이는 프로모터 내에 간 조직의 발현과 관련된 전사조절인자 HNF-3 및 Tf-LF1이 분포되어 있다는 것과 일치하는 경향이였다(Lemaigre et al., 1993, Guillou et al., 1991). 그리고 간 조직만큼은 아니지만 근육, 정소 및 비장에서도 발현이 확인되었고, 이와 같은 조직별 발현 양상은 어류 종에 따라 다양한 결과가 보고된 바 있다(Douglas et al., 2003, Bao et al., 2005).

미꾸라지 *hamp*의 발생단계별 발현은 gastrulation 단계 후 발현이 증가하다 안포(optic vesicle)형성 후 다시 감소하며 부화 후 1일 쯤부터 발현이 다시 증가하는 경향으로 나타났다. 이와 유사한 경향은 blunt snout bream LEAP-1에서도 보고되었다(Liang et al., 2013).

미꾸라지 *hamp* 유전자가 LPS 자극에 의해서 발현양이 증가하였으나, polyI:C 자극에 대해서 유의적 발현양의 차이를 나타내지 않았다. 본 결과는 polyI:C 혹은 바이러스 감염에 대해서 *hamp* 발현의 급속한 증가를 나타내는 돌돔(*O. fasciatus*), 틸라피아(*O. niloticus*) 및 지중해 돔(*S. aurata*)에서의 결과와 대조적이었다(Huang et al., 2007, Cho et al., 2009, Veldhoen and Duarte, 2010). 본 연구에서 수행된 실험의 경우 측정 시간 대와 농도가 한 구간이었으므로 추후 polyI:C 처리 시 다양한 농도와 시간 대 별 발현 측정 분석이 요구되며, 이를 통해 미꾸라지에서 *hamp* 유전자가 viral mimic에 반응하는지에 대한 최종결론이 필요할 것이다.

*E. tarda* 감염에 따른 *hamp* 유전자의 조직 별 발현 반응은 간 조직 외 신장, 장 및 비장에서도 매우 유의적인 유도 발현 방향으로 조절되는 경향을 따랐고, 본 연구에서 관찰된 미꾸라지 *hamp* 유전자 발현 결과는 항균 펩타이드 유전자 발현의 전형적인 특징과 잘 일치한다. 본 연구와의 유사한 결과들이 잉어, 대서양 대구(*G. morhua*), 부세(*L. crocea*), 참돔(*P. auriga*)

및 pacific mutton hamlet (*A. immaculatus*)등 에서 보고된 바 있다.

본 연구에서 철분 과부화에 대한 *hamp* 유전자의 반응 결과 이전 연구들에서 보고된 결과들과 유사하였으며, HAMP가 미꾸라지의 체내 철분 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 잘 보여주고 있다(Fraenkel et al., 2005, Rodrigues et al., 2006). 그리고 철분 과부화에 대한 HAMP 합성의 주요 기관이 간이라는 점은 넙치 및 그루퍼에서의 결과와 유사하였다(Hirono et al., 2005, Zhou et al., 2011). 그리고 철 과다 노출시 간 만큼이나 장(intestine)이 *hamp*의 유도발현에 역할을 한다는 본 연구의 결과는 돌돔의 *hamp*에서 관찰된 결과와 유사하였다(Cho et al., 2009).

미꾸라지 *hamp* 유전자는 중금속 노출에 대하여 조직 별 발현이 증가하는 경향을 나타내었는데 이는 미꾸라지 *hamp* 유전자의 5'-flanking 영역 내 존재하는 MRE motif 영향을 미치는 것으로 판단된다. 포유류 hepcidin 발현 또한 MTF-1에 의해 조절됨이 보고된 바있으며 연구가 있으며 농어목에 속하는 부세(Large yellow croaker)의 경우 카드뮴( $Cd^{2+}$ ) 노출에 대한 hepcidin 유전자 발현이 증가하여 본 연구 결과와 유사하였다(Chen et al., 2008, Balesaria et al., 2010).

*Leap2a*는 간 조직 다음으로 난소, 장, 피부, 근육, 정소의 순으로 발현이 높았다. 초어, 인간, 돼지 *leap2*의 조직별 발현 양상은 다양한 조직에서 발현이 나타나는 미꾸라지 *leap2*의 발현 양상과 유사하고(Krause et al., 2003, Sang et al., 2006, Liu et al., 2010), 간 조직 다음 발현이 높은 조직이 난소, 피부 조직이라는 초어의 연구결과와 유사하였다(Liu et al., 2010). *Leap2b*는 간 조직 외 다른 조직의 발현은 상대적으로 낮았다. 무지개송어의 경우 간 조직에서만 발현하는 경향으로 보고되어 미꾸라지 *leap2b*의 발현 패턴과 유사하였으나 무지개 송어의 경우 *leap2a* 역시 *leap2b*와 마찬가지로 간에서만 높은 발현을 나타낸다고 보고한 바 있어 본 연구와는 차이가 있었다

(Zhang et al., 2004).

미꾸라지 *leap2*의 발생과정중 발현은 isoform 특이적으로 나타났으며 *leap2a*와 *leap2b*가 최초 발현 시점 및 증감변화 패턴에서 서로 큰 차이를 나타내었다. *Leap2a*는 3-4개 체절이 생기기 시작하면서 발현이 증가하여 부화 후까지 발현이 증가하는 경향이며 *leap2b*는 gastrulation 후 발현이 미세하게 증가하다 다시 감소하여 부화 후 증가하는 경향이다. 초어 *leap2*의 발생에 따른 발현 패턴은 수정 후 16 세포기 - morular 까지 발현이 증가하다 다시 감소 후 근육반응기(muscular effect)부터 부화 후 2일까지 발현이 증가하는 경향으로 본 연구의 *leap2a*와 유사한 특징을 보였다(Liu et al., 2010). Blunt snout bream (*M. amblycephala*) *leap2*는 안포가 생기기 전까지 발현이 증가하다 gastrulation이 후 다시 발현이 감소하고, 심장의 본격적인 활동이 시작되는 시기에서 발현이 증가하기 시작하여 부화 이후 재 감소하는 경향을 가지는 *leap2a*와 유사한 경향을 나타내었다(Liang et al., 2013). 그리고 *hamp*와 *leap2*의 발현 경향은 상호 보완적 관계임을 알 수 있는데 blunt snout bream *leap-1*, 2의 발현 또한 유사한 것으로 보였다(Liang et al., 2013).

미꾸라지 *leap2*의 세균 감염에 따른 유도 발현 정도는 간, 신장, 비장 순으로 높게 나타났고, 각 조직에서 *leap2a*의 발현양이 *leap2b*보다 높았다. 잉어의 경우 *V. anguillarum* 감염 시 유도된 mRNA 발현양이 *leap2a*가 *leap2b*에 비하여 높고, 유도 발현 시점 또한 감염 후 6시간 또는 12시간째인 미꾸라지와 유사하였다. 그러나 *leap2a* 조직 별 발현 양상은 비장, 간, 신장 순으로 높아 간이 가장 높은 발현을 나타낸 본 연구의 미꾸라지에서의 결과와는 차이를 나타내었다(Yang et al., 2014). 또한 미꾸라지 간 조직에서 *leap2b*의 발현은 그람 양성균 감염 그룹이 그람 음성균 감염군 보다 높았다. 초어의 *leap2*는 *A. hydrophila* (gram negative) 감염 후 4 시간 쯤 간에서

발현이 가장 높게 나타났고, 비장, 신장 순으로 발현이 높게 관찰되어 미꾸라지 *leap2*와 같이 간에서 발현이 가장 높았다(Liu et al., 2010).

미꾸라지 *wap65* isoform의 조직 별 발현 특징은 간에서 가장 높은 발현을 나타내는 것 이외 다른 조직에서의 발현이 다양하게 관찰되어 다른 어종, 자주복(Hirayama et al., 2003), 송사리(Hirayama et al., 2004) 및 차넬 메기(Sha et al., 2008)와 다른 결과를 나타내었다. 그러므로 *wap65* 유전자의 조직별 기초 전사 발현 특징은 종 간 다른 경향을 나타내는 것으로 판단된다.

발생 단계에 따른 *wap65* isoform 발현 결과 *wap65-1*이 *wap65-2*에 비하여 초기 발생단계에 영향을 미치는 것으로 보이고, *wap65-2*는 부화 후 성장에 더 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 다른 종에서의 발생 단계별 유전자 발현 분석 정보는 매우 적은 편이지만 앞서 언급한 *wap65-1*의 발현이 초기 발생과정에 중요한 영향을 미치며 *wap65-2*의 발현이 후기 발생 및 부화과정에 중요한 영향을 주는 결과는 일반적으로 알려진 *wap65* isoform의 결과와 유사하였다(Picard and Schulte, 2004, Nakaniwa et al., 2005, Sarropoulou et al., 2010, Fernandino et al., 2011).

온도 자극에 따른 *wap65-1* 결과 다른 어류들 결과와 유사한 패턴을 나타내었지만(Kikuch et al., 1995, Kinoshita et al., 2011), *wap65* 유전자가 온도의 상승함에 따라 발현이 억제되는 경우는 기존 연구결과에서 확인되지 않았기 때문에 추가 연구가 더욱 필요한 것으로 판단된다. 비록 이전 연구에서는 *wap65* isoform 가운데 한 종류는 수온이 상승함에 따라 발현이 증가한다는 연구 결과가 보고되었지만 자주복과 송사리는 온도 변화에 의한 유전자 발현 변화가 관찰되지 않았다(Hirayama et al., 2003, Hirayama et al., 2004). 게다가 수온 변화에 따른 isoform 특이적 발현이 종(species)에 따라 다양한 것으로 보고되었다. 미꾸라지의 경우 *wap65-1*이 수온 변화에 따른

유전자 발현에 영향을 미치는 경향이 관찰되었지만 반대로 채널 메기에서는 *wap65-2*가 수온 변화에 대해 보다 민감하게 조절되는 것으로 나타났다. 미꾸라지와 같이 수온이 올라갈 때 *wap65-1* 발현이 증가하는 패턴을 나타내는 종으로는 금붕어, 잉어 및 강성돔(*A. schlegeli*)(Kikuchi et al., 1995, Choi et al., 2008, Kinoshita et al., 2011)이었다. 한편 남극대륙에 서식하는 어류(*Harpagifer antarcticus*; Perciformes)는 수온 변화에 *wap65* 유전자(*wap65-2*)가 반응하지 않으며 따라서 진화적 배경으로 특히 서식지 적응이 *wap65* 유전자에 매우 중요한 영향을 미칠 수 있음이 보고된 바 있다(Clark and Burns, 2008).

본 연구에서, 세균 감염에 따른 *wap65* isoform 반응은 *wap65-2*가 *wap65-1*에 비하여 보다 민감하게 반응하였으며, 본 연구 결과는 앞서 메기와 은어의 연구 결과와 유사하였다(Sha et al., 2008, Shi et al., 2010). 그러나 송사리와 자주복의 연구에서는 LPS 처리시 *wap65* 유전자의 발현 변화가 없다고 보고하여 본 연구와 차이가 있었다(Hirayama et al., 2003, 2004). 또한 본 연구와는 달리 농어의 경우 세균 감염에 대하여 *wap65-1*이 *wap65-2*에 비하여 월등히 높은 유도 발현을 나타내었다(Sarropoulou et al., 2010). 따라서 상기 결과들로 보아 면역 자극원에 대한 *wap65* isoform 별 발현 조절 방식 역시 종에 따라 큰 차이가 있음을 시사하고 있다.

미꾸라지 WAP65 isoform들은 중금속 노출에 차등 발현이 일어났는데 이는 구리 노출 시 스위드테일(*X. helleri*)의 *wap65* 유전자 발현 결과, 그리고 수온이 오염된 침전물에 노출된 대서양 대구의 *wap65* 발현이 증가한 연구와 유사하였다(Olsvik et al., 2011). 또한 농어의 경우 *wap65-1*이 중금속 종류에 따라 차등 발현 패턴에 차이가 있음을 나타낸 보고가 있다(Pierre et al., 2010). 중금속은 산화성 및 저 산소 스트레스를 나타내는 인자로 알려져 있으므로(Leonard et al., 2004, Firat et al., 2009) *wap65* isoforms들은 다

양한 중금속의 독성으로부터 발생한 세포학적 스트레스 대하여 저항의 기능을 하는 것으로 판단된다. 하지만 아직 어류 *wap65*가 isoform 특이적으로 중금속 노출에 반응하는 기작에 대해서는 보다 많은 연구정보가 수집되어야만 한다.

본 연구에서는 미꾸라지 항균 단백질 유전자 3종류(*hamp*, *leap2* 및 *wap65*)의 유전자 구조와 프로모터 분석, 그리고 다양한 시험조건에서의 발현 특징을 조사하였다. 본 연구를 통해 분석된 간 기원의 *hamp*, *leap2* 및 *wap65* 유전자들의 전반적인 발현 패턴을 종합해보면, 면역 자극시 가장 민감하고 높은 유도 발현을 보인다는 측면에서 *hamp* 유전자가 가장 주된 항균 단백질로서의 역할을 한다고 판단되며, 미꾸라지에서 single copy 단일 유전자로 존재하는 HAMP는 항균 펩타이드로서 살균기능과 더불어 철분 조절 그리고 중금속 등 세포 독성에 따른 염증반응에도 널리 관여하는 다기능 단백질로서 작용한다는 점을 알 수 있다. 반면 HAMP의 보완자적 역할로서 미꾸라지 LEAP2가 항균 기능을 갖고 LEAP2 내에 서로 분화된 2개의 isoform들은 아직 미꾸라지 내에서 선명한 기능의 세분화는 이루어지지 않은 상태라고 판단된다. 반면 경골어류 특이적으로 획득된 WAP65 isoform들은 이미 진화과정 중 isoform 특이적인 기능의 분화가 일어났고 WAP65-2 isoform이 선천성 면역에 보다 밀접하게 관여한다고 확인되었다. 또한 철분 과부화 실험 결과를 토대로 WAP65-2가 어류(미꾸라지) 선천성 면역에 참여하는 주요 방식 중 하나가 ISP로서의 작용임을 알 수 있었다. 하지만 WAP65-2가 직접적인 살균 작용등의 관여하는지에 대해서는 추후 연구가 필요한 상태이다. 본 연구결과를 기반으로 어류 선천성 면역 생체 방어 시스템에 있어 간 조직의 역할과 기능에 대한 보다 확대된 후속 연구들이 뒤따를 수 있으리라 예상되며 나아가 본 연구결과는 항균 작용 유전자들을 이용한 질병저항성 어류의 분자육종 또는 고활성의 재조합 항균 단

백질 개발을 위한 유용한 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대된다.



## 감사의 글

박사학위논문을 완성하면서 학부생부터 석사과정을 거쳐 공부하고 연구한 짧은 시간동안 많이 성장했는지, 박사학위를 받기에 부끄러움이 없는지 되내어 보았습니다. 그때마다 항상 부족함을 느끼며 그런 저를 가르쳐 주시고 힘을 주시는 분들이 많다는 것을 알 수 있었습니다. 감사합니다.

학부시절부터 박사학위까지 아낌없는 지도와 성장을 이끌어주신 남윤권 교수님 감사하고, 존경합니다. 또한 박사학위까지 연구를 하는데 있어 항상 신경써주신 김동수 교수님 감사합니다. 그리고 박사학위 논문을 심사해 주시고 많은 조언을 해주신 방인철 교수님, 노충환 박사님, 공승표 교수님 감사합니다. 대학을 입학하여 처음 받을 내딛는 학부생부터 연구를 본격적으로 시작한 대학원과정까지 다양한 학문을 소개해주시고 신경을 써주신 수산생물학과 교수님과 다른 학과임에도 불구하고 많은 가르침을 주신 김성구 교수님, 김기홍 교수님 감사드립니다.

연구실에 들어와서 실험과 연구 그리고 개인적인 문제까지 의논하며 지내 온 조영선 박사님, 김근용 박사님, 김이경 박사님, 윤문근 박사님 감사합니다. 연구실 막내로 지내는 동안 챙겨주시고 도와주신 박지은 선배님, 최별님 선배님, 하은미 선배님 감사합니다. 그리고 학위기간 동안 부족한 저 때문에 고생한 David, 김병수, 이정애, 이종민, 김은정, Em 후배님 감사합니다. 또한 다른 연구실이지만 연구에 대해서 의논하고 여러모로 도와주신 최승혁 박사님, 김연경 박사님, 정주연, 김민성, 류준형 후배님, 학과 동기 선후배님 감사합니다.

마지막으로 항상 저를 믿고 용기를 북돋아 주시는 부모님 감사하며 사랑합니다. 이제는 어엿한 한 가정의 가장이 된 형, 형 때문에 마음이 든든합니다. 그리고 언제나 긍정적 에너지로 힘을 주시는 형수님 고맙습니다. 또

한 항상 고맙게 반겨주는 친구 순성과 부모님 감사하며 자주 보지는 못하  
지만 따뜻한 고등학교 친구들 감사합니다. 아직 많이 부족하고 모자라지만  
그 동안 배운 지식과 노력으로 작성한 본 논문을 모두에게 바칩니다.



## 참고문헌

- Adams TK, Saydam N, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH. Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. *Environ Health Perspect* 2002;110:813-817.
- Aliza D, Ismail IS, Kuah MK, Shu-Chien AC, Muhammad TST. Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. *Physiol Biochem* 2008;34:129-138.
- Aoki T, Takano T, D.Santos M, Kondo H, Hirono I. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment* 2008;5:263-276.
- Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 2005;10: 973-979.
- Balesaria S, Ramesh B, McArdle H, Bayele HK, Srari SKS. Divalent metaldependent regulation of hepcidin expression by MTF-1. *FEBS Lett* 2010;584:384-390.
- Bao B, Peatman E, Li P, He C, Liu Z. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol* 2005;29:939-950.
- Bao B, Peatman E, Xu P, Li P, Zeng H, He C, Liu Z. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated. *Mol Immunol.* 2006;43(4):367-377.
- Bevins CL, Martin-Porter E, Ganz T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut* 1999;45(6):911-915.

- Chen J, Shi YH, Li MY. Changes in transferrin and hepcidin genes expression in the liver of the fish *Pseudosciaena crocea* following exposure to cadmium. *Arch Toxicol* 2008;82:525-530.
- Clark MS, Burns G. Characterization of the warm acclimated protein gene (wap65) in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*). *DNA Seq* 2008;19:50-55.
- Cho YS, Lee SY, Kim KH, Kim SK, Kim DS, Nam YK. Gene structure and differential modulation of multiple rockbream (*Oplegnathus fasciatus*) hepcidin isoforms resulting from different biological stimulations. *Dev Comp Immunol* 2009;33:46-58.
- Douglas SE, Patrzykat A, Pytyck J, Gallant JW. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Eur J Biochem* 2003;270:3720-30.
- Ellis AE. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 2011;25:827-839.
- Fernandino JI, Popesku JT, Paul-Prasanth B, Xiong H, Hattori RS, Oura M, et al. Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of pejerrey *Odontesthes bonariensis* using a heterologous microarray. *Sex Dev* 2011;5:89-101.
- Firat O, Cogun H.Y, Aslanyavrusu S, Kargin F. Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn + Cd exposures. *J Appl Toxicol* 2009;29:295-301.
- Fraenkel PG, Traver D, Donovan A, Zahrieh D, Zon LI. Ferroportin 1 is required for normal iron cycling in zebrafish. *J Clin Invest*

2005;115:1532-1541.

- Fukami T1, Nakajima M, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. CYP2A7 polymorphic alleles confound the genotyping of CYP2A6 allele. *Pharmacogenomics J* 2006;6(6):401-412.
- Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003;102:783-788.
- Guillou F, Zakin MM, Part D, Boissier F, Schaeffer E. Sertoli cell-specific expression of the human transferrin gene. Comparison with the liver-specific expression. *J Biol Chem* 1991;266(15):9876-9884.
- Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000;8(9):402-410.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 2004;18:2195-2224.
- Hilton KB, Lambert LA. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene* 2008;415:40-8.
- Hirayama M, Kobiyama A, Kinoshita S, Watabe S. The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. *J Exp Biol* 2004;207:1387-98.
- Hirayama M, Nakaniwa M, Ikeda D, Hirazawa N, Otaka T, Mitsuboshi T, et al. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish Physiol Biochem* 2003;29:211-224.
- Hirono I, Hwang JY, Ono Y, Kurobe T, Ohira T, Nozaki R, et al. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS J* 2005;272:5257-5264.
- Hu X, Ward C, Aono S, Lan L, Dykstra C, Kempainen RJ, Morrison EE,

- Shi J. Comparative analysis of *Xenopus tropicalis* hepcidin I and hepcidin II genes. *Gene*. 2008 Dec 15;426(1-2):91-97.
- Huang PH, Chen JY, Kuo CM. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Mol Immunol* 2007;44:1922-1934.
- Kikuchi K, Watabe S, Aida K. The Wap65 gene expression of goldfish (*Carassius auratus*) in association with warm water temperature as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS). *Fish Physiol Biochem* 1997;17:423-432.
- Kikuchi K, Watabe S, Suzuki Y, Aida K, Hakajima H. The 65-kDa cytosolic protein associated with warm temperature acclimation in goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Physiol B* 1993;163:349-354.
- Kikuchi K, Yamashita M, Watabe S, Aida K. The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. *J Biol Chem* 1995;270(17):87-92.
- Kim DS, Jo JY, Lee TY. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture* 1994;120:263-270.
- Kim YO, Park EM, Moon JY, Nam BH, Kim DG, Kong HJ, Kim WJ, Jee YJ and Lee SJ. Genetic organization of two types of flounder warm-temperature acclimation-associated 65-kDa protein and their gene expression profiles. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013;77:2065-2072.
- Kinoshita S, Itoi S, Watabe S. cDNA cloning and characterization of the warm-temperature-acclimation-associated protein Wap65 from carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol Biochem* 2011;24:125-134.

- Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly-disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 2000;480:147-150.
- Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Klüver E, Maronde E, Conejo-García JR. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. Protein Sci 2003;12:143-152.
- Lee SY, Kim BS, Noh CH, Nam YK. Genomic organization and functional diversification of two warm-temperature - acclimation- associated 65-kDa protein genes in rockbream (*Oplegnathus fasciatus* ; Perciformes). Fish Shellfish Immunol 2014;37(1):11-21.
- LEE SY, Nam YK. Isolation and mRNA Expression of Metallothionein Isoforms from Rockbream *Oplegnathus fasciatus*. Fish Aquat Sci 2011;44:21-27.
- Lemaigre FP, Durviaux SM, Rousseau GG. Liver-specific factor binding to the liver promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2, 6-bisphosphatase gene. J Biol Chem 1993;268(26):19896-19905.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Rad Biol Med 2004;37:1921-1942.
- Li HX, Lu XJ, Li CH, Chen J. Molecular characterization and functional analysis of two distinct liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). Fish Shellfish Immunol. 2014;38(2):330-339.
- Liang T, Ji W, Zhang GR, Wei KJ, Feng K, Wang WM. Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama*

- amblycephala*). Fish Shellfish Immunol 2013;35:553-563.
- Liu F, Li JL, Yue GH, Fu JJ, Zhou ZF. Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp. Vet Immunol Immunopathol 2010;133(2):133-143.
- Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nat Rev Immunol. 2005;5(6):472-484.
- Masso-Silva J, Diamond G, Macias-Rodriguez M, Ascencio F. Genomic organization and tissue-specific expression of hepcidin in the pacific mutton hamlet, *Alphestes immaculatus* (Breder, 1936). Fish Shellfish Immunol 2011;31(6):1297-1302.
- Mendeizon D, Boissier F, Zakin MM. The binding site for the liver-specific transcription factor Tf-LF1 and the TATA box of the human transferrin gene promoter are the only elements necessary to direct liver specific transcription in vitro. Nucleic Acids Res 1990;18:5717-5721.
- Nakaniwa M, Hirayama M, Shimizu A, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, et al. Genomic sequences encoding two types of medaka hemopexin-like protein Wap65, and their gene expression profiles in embryos. J Exp Biol 2005;208:1915-1925.
- Nam BH, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Lee SJ, Choi TJ Identification and characterization of the prepro-vasoactive intestinal peptide gene from the teleost *Paralichthys olivaceus*. Vet Immunol Immunopathol 2009;127(3):249-258.
- Nam BH, Moon JY, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Lee SJ, Kim KK. Multiple beta-defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus*. Fish Shellfish Immunol.

2010;28(2):267-274.

- Nam BH, Moon JY, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Kim KK, Lee SJ. Molecular and functional analyses of growth hormone-releasing hormone (GHRH) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2011;159(2):84-91.
- Nam YK, Park JE, Kim KK, Kim DS. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Res* 2003;12:523-525.
- Ochoa A, Brunel F, Mendelzon D, Cohen GN, Zakin MM. Different liver nuclear proteins bind to similar DNA sequences in the 50 flanking regions of three hepatic genes. *Nucleic Acids Res* 1989;17:119-133.
- Olsvik PA, Brattås M, Lie KY, Goksøyr A. Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway. *Chemosphere* 2011;83:552-563.
- Okumura CY, Hollands A, Tran DN, Olson J, Dahesh S, von Köckritz-Blickwede M, Thienphrapa W, Corle C, Jeung SN, Kotsakis A, Shalwitz RA, Johnson RS, Nizet V. A new pharmacological agent (AKB-4924) stabilizes hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and increases skin innate defenses against bacterial infection. *J Mol Med (Berl)* 2012;90(9):1079-1089.
- Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct* 1999;6:926-931.

- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hecidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806-7810.
- Pierre S, Coupé S, Prévot-d'Alvise N, Gaillard S, Richard S, Gouze E, et al. *Cloning of Wap65 in sea bass (Dicentrarchus labrax) and sea bream (Sparus aurata) and expression in sea bass tissues.* *Comp Biochem Physiol Part B* 2010;155:396-402.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-7819.
- Press CML, Evensen Ø. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9(4):309-318.
- Rodrigues PN, Vázquez-Dorado S, Neves JV, Wilson JM. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev Comp Immunol* 2006;30:1156-1167.
- Rombout JH, Huttenhuis HBT, Picchiatti S, Scapigliati S. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2005;19:441-455.
- Sang Y, Ramanathan B, Minton JE, Ross CR, Blecha F. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepcidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection. *Dev Comp Immunol* 2006;30(4):357-366.
- Sarropoulou E, Fernandes JMO, Mitter K, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre MP, et al. Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Mol Phylogenet Evol* 2010;55:640-649.

- Sha Z, Xu P, Takano T, Liu H, Terhune J, Liu Z. The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. *Mol Immunol* 2008;45:1458-1469.
- Shi JS, Camus AC. Hecidins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?. *Dev Comp Immunol* 2006;30:746-755.
- Shi YH, Chen J, Li CH, Li MY. Molecular cloning of liver Wap65 cDNA in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes following *Listonella anguillarum* infection. *Mol Biol Rep* 2010;37:1523-1529.
- Shike H, Lauth X, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 2002;269:2232-2237.
- Shike H, Shimizu C, Lauth X, Burns JC. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates. *Dev Comp Immunol* 2004;28(7):747-754.
- Skaar EP. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Pathog* 2010;6(8):e1000949.
- Stoytcheva ZR, Vladimirov V, Douet V, Stoychev I, Berry MJ. Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal- responsive genes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:416-424.
- Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. Structure of human hemopexin: Oglycosyl and N-glycosyl sites and unusual clustering of tryptophan residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;81:2021-2025.
- Truksa J, Lee P, Peng H, Flanagan J, Beutler E. The distal location of the

- iron responsive region of the hepcidin promoter. *Blood* 2007;110:3436-3437.
- Truksa J, Lee P, Beutler E. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness. *Blood* 2009;113:688-695.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 2011;56(10):486-503.
- Veldhoen M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Immunology* 2010;22:747-752.
- Verga-Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Hepcidin: iron-hormone and antimicrobial peptide. *Gene* 2005;364:37-44.
- Vyoral D, Petrak J. Hepcidin: a direct link between iron metabolism and immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1768-1773.
- Viatte L, Vaulont S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009;91:1223-1228.
- Wang KJ, Cai JJ, Cai L, Qu HD, Yang M, Zhang M. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides* 2009;30:638-646.
- Wang P, Jin T. Oct-1 functions as a sensor for metabolic and stress signals. *Islets* 2010;2(1):46-48.
- Yang G, Guo H, Li H, Shan S, Zhang X, Rombout JH, An L. Molecular characterization of LEAP-2 cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the differential expression upon a *Vibrio anguillarum* stimulus; indications for a significant immune role in skin. *Fish Shellfish Immunol* 2014;37(1):22-29.
- Zhang YA, Zou J, Chang CI, Secombes CJ. Discovery and characterization of

two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;101:259-269.

Zhou JG, Wei JG, Xu D, Cui HC, Yan Y, Ou-Yang ZL, et al. Molecular cloning and characterization of two novel hepcidins from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 2011;30:559-568.

