



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

넙치의 스쿠티카증 및 바이러스성
출혈성 패혈증 예방을 위한 DNA 백신
제작 및 방어효과 분석



2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

임 현 주

이 학 석 사 학 위 논 문

넙치의 스쿠티카증 및 바이러스성
출혈성 패혈증 예방을 위한 DNA 백신
제작 및 방어효과 분석

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

임 현 주

임현주의 이학석사 학위논문을 인준함

2019년 2월 22일



위원장 이학박사 김도형 (인)

위원 이학박사 정현도 (인)

위원 이학박사 김기홍 (인)

목 차

Abstract	iv
List of Tables	viii
List of Figures	ix
 제 1 장 녀치의 스쿠티카증에 대한 DNA 백신의 방어 효과	1
 I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	5
1. 섬모충 및 실험어	5
2. Vector 제작	5
3. <i>In vivo</i> 실험	8
가. Immunization	8
나. Challenge test	8
III. 결 과	11
1. <i>In vivo</i> 실험	11
IV. 고 찰	13

제 2 장 넓치의 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 DNA 백신의 방어 효과 ..15

I. 서 론	16
II. 재료 및 방법	18
1. 세포, 바이러스 및 실험어	18
2. Vector 제작	19
3. <i>In vitro</i> 에서 miR-155 발현 확인	21
4. <i>In vivo</i> 실험	21
가. 1 st experiment (10 μ g of plasmids)	21
나. 2 nd experiment (1 μ g of plasmids)	22
5. Serum virucidal activity	22
6. Serum neutralization test	23
7. 통계 분석	23
III. 결 과	26
1. <i>In vitro</i> 에서 miR-155 발현 확인	26
2. <i>In vivo</i> 실험	28
3. Serum virucidal activity	31
4. Serum neutralization test	33
IV. 고 찰	35

제 3 장 Minicircle DNA 백신 제작 및 zebrafish 내에서의 VHSV에 대한 방어효과 비교 분석	37
I. 서 론	38
II. 재료 및 방법	40
1. 세균, 바이러스 및 실험어	40
2. Minicircle DNA 제작	40
가. Parental plasmid 제작	40
나. 세균 내에서의 minicircle DNA 형성 유도	41
3. Plasmid persistence 분석	44
가. Zebrafish 내에 근육 주사	44
나. Genomic DNA 분리 및 real-time PCR	44
III. 결 과	49
1. Minicircle DNA 제작	49
2. Plasmid persistence 분석	51
IV. 고 찰	53
요 약	55
감사의 글	59
참고문헌	61

**Protection of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) from
scuticociliatosis and viral hemorrhagic septicemia virus disease using
DNA vaccines**

HYUN JU LIM

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

DNA vaccine, one of the many vaccines in progress, has the advantage of inducing cellular and humoral immune responses simultaneously by expressing foreign antigen protein. In this study, we produced DNA vaccine against *Miamiensis avidus*, causative agent of scuticociliatosis, and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) to induce protective effect in fingerlings of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Also, we used minicircle DNA vaccine to increase *in vivo* safety of DNA vaccine.

First, scuticociliatosis has severely damaged to culture farms of olive flounder and there haven't been developed effective *in vivo* vaccine. This study aimed to know the protective effect of DNA vaccines encoding leucine-rich repeat (LRR) protein gene of *M. avidus*. To enhance immunogenicity, the N-terminal of antigen gene was fused with the secretion signal of VHSV glycoprotein (vGsp), which make the expressed antigens be secreted out of cells and could enhance the chance of being recognition by antigen presenting cells. Furthermore, the C-terminal of antigen was fused with *Vibrio anguillarum* flagellin-A (FlaA) gene that is outer protein of bacterial flagella and serves as

adhesion factor. Consequently, three DNA vaccine vectors were constructed using the pcDNA 3.1(+) plasmid as a basic vector; LRR alone (pc-L), vGsp fused to the upstream of LRR (pc-VL), and FlaA linked to the downstream of vGsp-LRR (pc-VLF). Fingerings of olive flounder were intramuscularly immunized with 10 μ g of plasmid and at 3 weeks post-immunization (w.p.i), fishes were intraperitoneally challenged with *M. avidus*. The result showed that fishes immunized with pc-VL and pc-VLF showed significantly lower mortalities than control and other immunized groups. These results suggest that the fusion of LRR with FlaA and/or with vGsp can be a way to enhance antigen immunogenicity.

Second, rhabdovirus glycoprotein-based DNA vaccine is well-known antigen and demonstrated by lots of studies. We used VHSV glycoprotein (vG) as antigen and focused on the effectiveness of microRNA as molecular adjuvant. miRNA, which is small non-coding RNA, regulate gene expression by binding to the target mRNA. In this study, we used one of microRNA present in olive flounder, miR-155. We designed two DNA vaccine vectors using pFC plasmid as a basic vector; antigen only (pFC-vG) and with miR-155 (pFC-vG-miR155). Fingerings of olive flounder were intramuscularly immunized with 10 μ g and 1 μ g of plasmid and at 4 w.p.i, fishes were intramuscularly challenged with VHSV. The result showed that fishes immunized with pFC-vG and pFC-vG-miR155 showed mortality less than 20 % in all *in vivo* experiment. And virucidal activity was analyzed at 3, 7, 14 and 28 d.p.i with fishes injected with 10 μ g of plasmid. Results showed that in VHSV, the virucidal titer of both pFC-vG and pFC-vG-miR155 was higher than control group at all time. However, in HIRRV, only pFC-vG-miR155 group at 3 d.p.i showed high virucidal titer. These suggest that miR-155 is involved in non-specific innate immune response so pFC-vG-miR155 group showed protective effect against both VHSV and HIRRV at 3 d.p.i. Moreover,

we confirmed that serum of all experimental group at 28 d.p.i neutralized VHSV. Thus, adaptive humoral immune response was induced by DNA vaccines produced in this study.

Finally, the DNA vaccine has a lot of advantages but there are some problems against safety because of the antibiotic resistance gene. Minicircle is DNA consisted of minimal components capable of expressing a foreign gene. It doesn't contain the replication origin and antibiotic resistance gene in the plasmid, and has the advantage of continuously expressing a foreign gene. In this study, we used minicircle DNA, which is inserted glycoprotein (G) gene and matrix protein gene (M) of VHSV as antigen to focus on safety. Matrix protein of VHSV is known to induce cell apoptosis. So we aimed to remove plasmid DNA quickly by inducing cell apoptosis. Four parental vaccine vectors were constructed to produce minicircle DNA; G or M alone (pMC-G, pMC-M), G with M in each cassette (pMC-MG), and EGFP as control (pMC-EGFP). Minicircle DNA is constructed by site-specific recombination in ZYCY10P3S2T *Escherichia coli* (Gmc, Mmc, MGmc and EGFPmc). Zebrafish was immunized in muscle with 1 μ g of each parental plasmid and minicircle DNA. Muscle of injected site was sampled at 1, 4, 6 and 8 w.p.i. and analyzed plasmid persistence by real-time PCR. Results showed that minicircle DNA was continuously expressed longer than plasmid DNA in EGFP and G group. But in M and MG group, plasmid DNA persisted longer than minicircle DNA. These suggest that the minicircle DNA including M gene was degraded by cell apoptosis faster than plasmid DNA, because numerous of minicircle DNA, which is relatively small, entered the cell more efficiently than plasmid DNA.

In vivo experiment against *M. avidus* and VHSV showed protective effect, and induction of adaptive humoral immune response was confirmed in G-based DNA vaccine. Also, antigen immunogenicity was improved using molecular adjuvant, so the protective mechanism by these antigens and by the present

DNA vaccine constructs should be investigated through further studies. In third experiment, it is necessary to confirm the defense effect through *in vivo* challenge experiment and suggested possibility as molecular adjuvant of matrix protein of VHSV.



List of Tables

Table 1. Summary of primer used in this study	9
1-1. For construction of pc-EGFP vector	9
1-2. For construction of LRR group (pc-L, pc-VL and pc-VLF) vector	10
Table 2. Summary of primer used in this study	25
2-1. For construction of pFC-vG vector	25
2-2. For construction of pFC-vG-miR155 vector	25
Table 3. Summary of primer used in this study	47
3-1. For construction of parental plasmid	47
3-2. For real-time PCR analysis	48

List of Figures

Fig 1-1. Construction of scuticociliate DNA vaccine	7
Fig 1-2. Cumulative mortality of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) challenged with 2×10^4 ciliates/fish of <i>Miamiensis avidus</i> after 4 weeks post immunization	12
Fig 2-1. Construction of VHSV DNA vaccine	20
Fig 2-2. Quantification of miR-155 in <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC) cells using real-time RT-PCR	27
Fig 2-3. Cumulative mortality of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) challenged with 10^2 pfu/fish and 10^3 pfu/fish of VHSV after immunization with 10 μ g of plasmids and PBS	29
Fig 2-4. Cumulative mortality of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) challenged with 5×10^3 pfu/fish and 5×10^4 pfu/fish of VHSV after immunization with 1 μ g of plasmids and PBS	30
Fig 2-5. Serum virucidal activity against VHSV and HIRRV with 3, 7, 14 and 28 days post immunization (d.p.i)	32
Fig 2-6. Serum neutralization test against VHSV with 4 weeks post immunization (w.p.i)	34
Fig 3-1. Construction of parental plasmid for minicircle DNA	43
Fig 3-2. Formula for plasmid copy number calculation	45
Fig 3-3. Standard curve for plasmid and minicircle DNA copy number calculation	46

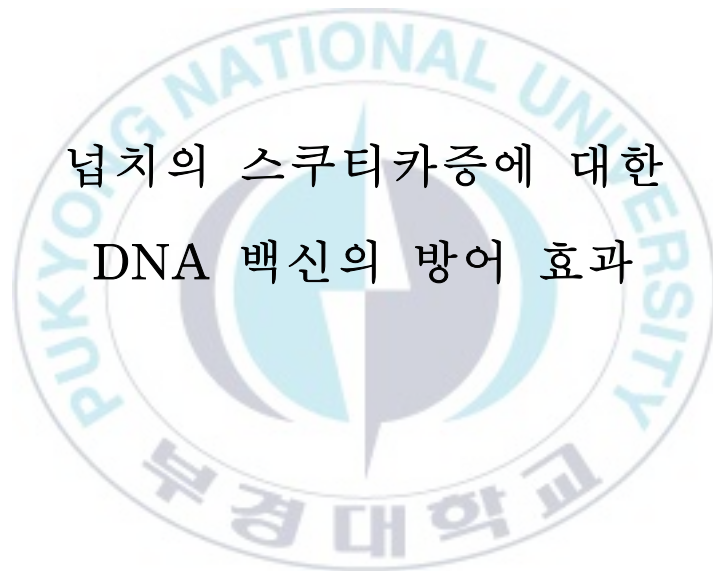
Fig 3-4. Electrophoresis of plasmid and minicircle DNA in 1 % agarose gel ·50

Fig 3-5. Copy number of plasmid and minicircle DNA in 1, 4, 6 and 8 weeks
post-immunized (w.p.i) zebrafish's muscle 52



제 1 장

넙치의 스쿠티카증에 대한
DNA 백신의 방어 효과



I. 서론

DNA 백신은 다양한 연구가 진행되고 있는 백신 중 하나로, 외부 항원 유전자를 발현 vector에 삽입하여 eukaryotic promoter로 발현함으로써 생체 내 면역반응을 유도하며 병원체에 대한 방어기작을 나타낼 수 있도록 한다. 숙주세포 내로 삽입된 plasmid는 외부 항원 단백질을 발현하여 항원 제시 세포 (APC)에 의해 인식되어 세포성 면역 반응을 유도하고, 발현된 항원을 B cell이 직접 인식하여 항원에 대한 항체를 생산하는 체액성 면역 반응 또한 유도할 수 있다. DNA 백신은 약독화 백신 또는 생백신 등에서 일어날 수 있는 안전성 문제를 극복할 수 있으며, 재조합 단백질 subunit vaccine에 비해 제작이 쉽다는 장점이 있다. 또한 plasmid의 취급과 보관이 용이하고 적은 양의 plasmid로 높은 효과를 볼 수 있으며, 이러한 측면에서 볼 때 경제적이라고 할 수 있다.

포유류의 protozoan 기생충에 대해서는 이미 많은 연구가 되어있으며, 어류 기생충인 *Cryptocaryon irritans*, *Ichthyophthirius multifiliis* 그리고 *Cryptobia salmositica* 등에 대해서도 DNA 백신이 연구된 바 있다 (Jose Priya et al., 2012; Louise et al, 2012; Woo, 2010). 본 연구에서는 양식산 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 심각한 피해를 입히는 질병인 스쿠티카증의 원인 섬모충인 *Miamiensis avidus*를 대상으로 하였다. *M. avidus*는 Parauronematidae과의 기회성 기생충으로, 해수 환경에서 유기물 및 세균을 섭취하며 숙주의 아가미, 간, 신장, 근육 그리고 뇌와 같은 조직을 갉아 먹어 폐사를 일으킨다. 본 연구에서 스쿠티카증에 대한 항원으로 사용한 단백질은 leucine rich repeat protein (LRR)으로, leucine이 20-30 개 정도로 반복되는 단백질의 구조적 motif이다. LRR은 주로 세포 표면에 위치하

며 toll-like receptor (TLR), tropomodulin (TMOD) 등의 다양한 단백질에 존재한다. 또한 기생충과 숙주간의 상호 작용에 관여한다고 알려져 있으며 (Devault et al., 2008), 다양한 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)를 인식하여 숙주 내에서의 초기 방어를 유도한다 (Nürnberg et al., 2004). 그리고 선행연구에서 스쿠티카충의 LRR을 재조합 단백질 백신으로 사용하여 zebrafish 내에서의 방어 효과를 확인한 바 있다 (Lee et al., 2009). 따라서 LRR을 스쿠티카충에 대한 항원으로 선정하였으며, 넙치 치어에서의 방어 효과를 보고자 하였다.

이전부터 백신의 효과를 증진시키기 위한 목적으로 adjuvant가 널리 사용되어 왔으며, DNA 백신 또한 면역원성을 높이기 위하여 다양한 adjuvant를 사용하려는 시도가 있었다 (Li et al., 2016). 그 중 molecular adjuvant는 plasmid에서 단백질로 발현되어 adjuvant의 역할을 하는데, 본 연구에서는 DNA 백신의 plasmid에 immunostimulant 및 molecular adjuvant를 연결하여 숙주의 면역원성을 높이도록 하였다. Immunostimulant로는 secretion signal peptide를 사용하였는데, 바이러스의 secretion signal peptide는 단백질의 위치를 결정하는 기능 이외에도 바이러스의 종류에 따라 다양한 역할을 한다고 알려져 있다 (Kapp et al., 2009). Rhabdovirus의 negative single strand RNA 바이러스인 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 glycoprotein 유전자 (G gene)를 항원으로 한 DNA 백신이 이미 많은 연구로 효과가 입증되어 있다. 본 연구에서는 이 G gene의 secretion signal peptide (vGsp)를 항원의 N-terminal에 fusion함으로써 항원 단백질이 세포 밖으로 분비되도록 하였으며, 따라서 숙주의 면역 반응을 자극하고자 하였다. Molecular adjuvant로는 flagellin을 사용하였는데, 그람 음성 단간균인 *Vibrio anguillarum*의 flagellum은 세균의 운동성뿐만 아니라 병원성과도 관련이 있는데, 이 flagellum의 외부 단백질인

flagellin-A (FlaA)는 vibrio 뿐만 아니라 다른 세균에서도 그 효과가 입증되었다 (Milton et al. 1996). 따라서 본 연구에서는 *V. anguillarum*의 FlaA 단백질을 항원 유전자의 C-terminal에 (Gly-Ser-Gly)₃ linker로 연결함으로써 vGsp와 마찬가지로 면역 반응을 자극하고자 하였으며, 병원체에 대한 DNA 백신의 방어 효과를 높이기 위해 실험을 진행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 섬모충 및 실험어

실험에 사용된 섬모충 *Miamiensis avidus*는 2015년도에 넙치의 뇌에서 분리하였다. 섬모충은 10 % fetal bovine serum (FBS, WELGENE)와 1 % penicillin-streptomycin (Pen Strep, WELGENE)을 포함한 Leibovitz-15 배지 (L-15, Sigma)에서 키운 *Epitheiloma papulosum cyprini* (EPC) cell 을 급이하여 20℃에서 배양하였다.

실험어인 넙치는 부산광역시 강서구 명지동의 수산자원연구소에서 운반하여 왔으며 평균 전장 7.76 ± 1 cm, 체중 2.94 ± 1 g (n=10) 이다. 운반 후 7일간 20℃에서 순치하였으며, 병원체 감염 여부를 확인하기 위하여 기생충, 세균 그리고 바이러스 검사를 진행하여 음성을 확인한 후 실험을 진행하였다.

2. Vector 제작

스쿠티카충의 cDNA 중 leucine-rich repeat (LRR) 유전자의 partial ORF 를 증폭하기 위하여, 섬모충의 RNA를 분리하여 (Hybrid-R, GeneAll) cDNA를 oligo dT (Hyperscript RT premix, GeneAll)를 이용하여 합성하였다. 항원 유전자가 BamH I -Xba I enzyme site를 포함하며 시작코돈인

ATG와 종료코돈인 TAG를 포함하도록 primer를 디자인하여 증폭하였고, gel extraction 후 pGEM-T easy vector (Promega)에 cloning 하였다 (Table 1).

LRR의 N terminal에 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)의 항원인 glycoprotein (G)의 secretion signal peptide (vGsp)를, C terminal에 *Vibrio anguillarum*의 항원인 flagellin-A (FlaA)를 fusion하기 위하여 vGsp와 FlaA의 유전자를 각각 PCR로 증폭하였다. 또한 LRR은 partial ORF를 PCR로 증폭하였으며, 증폭한 각각의 산물을 overlapping PCR로 fusion하였다. LRR 유전자의 ORF와 FlaA 유전자는 (GlySerGly)₃ linker를 사용하여 연결하였으며, vGsp-LRR-FlaA의 양 끝을 AflII-Not I enzyme site를 포함하도록 PCR로 증폭, gel extraction 후 cloning 하였다.

pGEM-T easy vector에 cloning한 유전자는 제한효소를 처리하여 pcDNA 3.1(+) vector (Invitrogen)에 삽입하여 cytomegalovirus (CMV) promoter로 발현되도록 하였다. 추가적으로 FlaA 유전자에 대한 control vector를 제작하기 위하여, vGsp-LRR 유전자의 ORF까지 증폭하는 reverse primer와 pcDNA 3.1(+) vector의 bovine growth hormone (bGH) poly(A) signal 앞부분을 증폭하는 forward primer를 새로이 디자인하였고 PCR로 증폭하여 overlap cloner (Elpis)로 반응하였다. 또한 vector control로 enhanced green fluorescent protein (EGFP) 유전자를 AflII-EcoR I 으로 삽입하였고, 최종적으로 완성된 각각의 vector들은 sequence를 모두 확인하였으며 (Macrogen sequencing service, Korea), pc-EGFP, pc-L, pc-VL 그리고 pc-VLF라 명명하였다 (Fig 1-1).

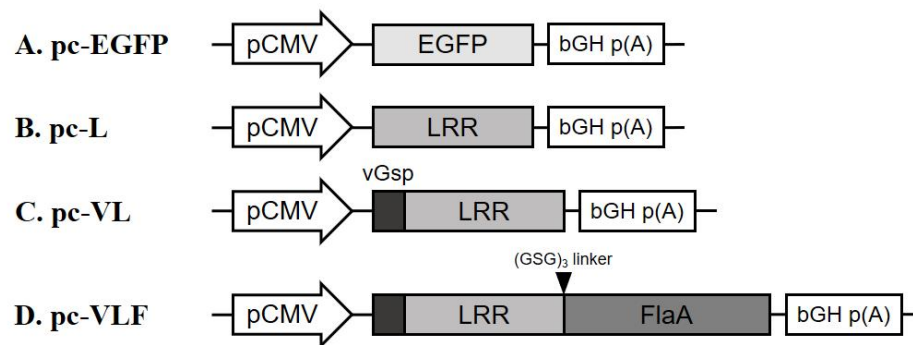


Fig 1-1. Construction of scuticociliate DNA vaccine. **(A)** EGFP gene was inserted in pcDNA 3.1(+) vector. pc-EGFP was used as vector control. **(B)** pc-L **(C)** vGsp was fused with N-terminal of LRR and **(D)** FlaA was fused with C-terminal of LRR.

3. *In vivo* 실험

가. Immunization

넙치에서 섬모충에 대한 DNA vaccine의 효과를 보기 위하여, 각각의 vector를 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 phosphate-buffered saline (PBS)로 희석하여 group 당 30마리씩 근육 주사하였고, control group은 PBS를 주사하였다.

나. Challenge test

DNA vaccine 주사 21일 이후 섬모충 2×10^4 ciliates/fish를 group 당 15마리씩 복강 주사하였다. 실험 중 폐사한 넙치는 즉시 수조에서 건져 복수, 내부 장기 및 뇌를 분리하여 섬모충이 있는지 확인하였고, 폐사는 2주간 관찰하였다.

Table 1. Summary of primer used in this study

1-1. For construction of pc-EGFP vector

Name	Sequence (5'-3')
EGFP_AflII_F	CTTAAG ATGGTGAGCAAGGGCGAG
EGFP_EcoR I_R	GAATTC TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)



1-2. For construction of LRR group (pc-L, pc-VL and pc-VLF)
vector

Name	Sequence (5'-3')
LRR_ATG_BamH I _F	GGATCC ATGTTTAATCAAAACAAATTATTTCA ACTACC
LRR_TAG_Xba I _R	TCTAGA CTATATTTGTTTCAAAGGATTACCAT C
vGsp_LRR_F	CATCATCATAAAAAGCACCATCATTTAATC AAAACAAATTATTTTC
vGsp_LRR_R	GAAATAATTTGTTTTGATTAAATGATGTGGTG CTTTTATGATGATG
LRR_linker_R1	CGCCTCCACCTGAACCGCCTCCACCTATTTGTT TCAAAGGATTACCATC
LRR_linker_R2	CACCTGAACCGCCTCCACCTGAACCGCCTCCACC TATTTGTTTCAAAGG
linker_FlaA_F1	CAGGTGGAGGCGGTTTCAGGTGGAGGCGGTTCAA TGACCATTACAGT
linker_FlaA_F2	GGCGGTTTCAGGTGGAGGCGGTTCAATGACCATT ACAGTAAATACTAACG
vG_Afl II _F	CTTAAG ATGGAATGGAATACTTTTTTCTTGG
FlaA_Not I _R	GCGGCCGC TTACTGCAATAGTGACATTGC
LRR_bGH_OC_R	ATCAGCGGGTTTAAACTATTTGTTTCAAAGGA TTACCATCAATTTGTAG
pcDNA_bGH_앞쪽_F	GTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Ⅲ. 결 과

1. *In vivo* 실험

DNA vaccine 주사 21일 이후 섬모충 2×10^4 ciliates/fish를 group 당 15 마리씩 복강 주사하였으며, 2주간 폐사를 관찰하였다. 폐사는 섬모충 challenge 후 다음 날부터 점진적으로 나타났으며, 11일째부터는 더 이상 죽지 않았다. 실험 결과, vGsp를 결합한 pc-VL 및 pc-VLF group의 폐사율이 각각 40 %, 43.8 %로 낮게 나타났으며 나머지 group은 모두 60 % 이상의 폐사율을 보였다 (Fig 1-2).

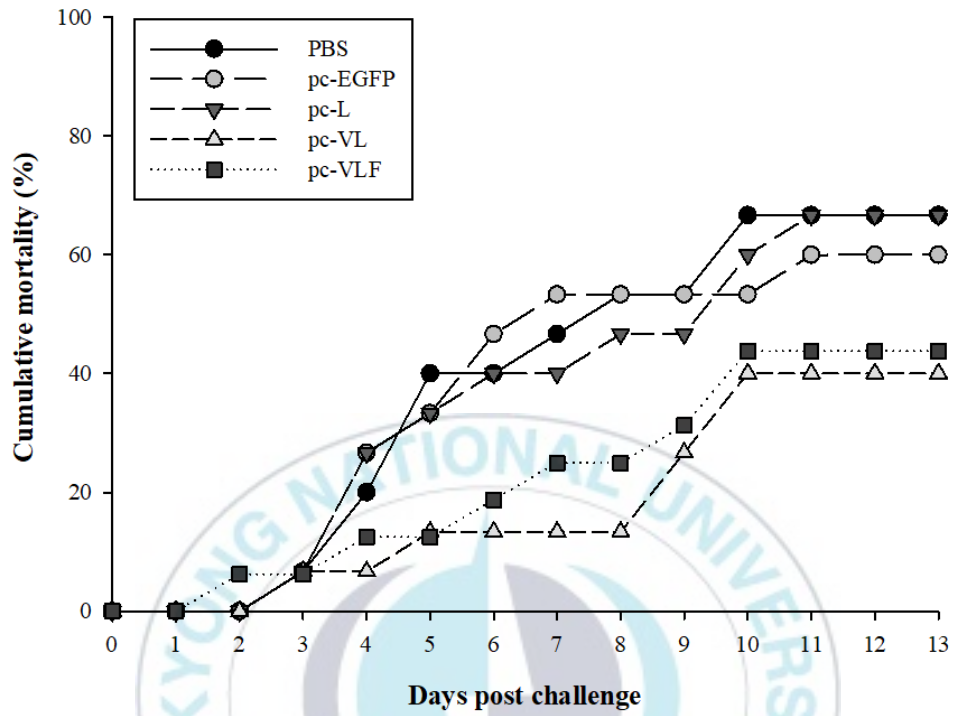


Fig 1-2. Cumulative mortality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with 2×10^4 ciliates/fish of *Miamiensis avidus* after 4 weeks post immunization.

IV. 고 찰

본 연구에서는 *M. avidus*의 항원 leucine-rich repeat protein (LRR) 유전자를 secretion signal peptide 및 flagellin과 조합하여 DNA 백신을 제작하였다. 넙치 치어에서의 *in vivo* 실험 결과, pc-VL 및 pc-VLF group이 상대적으로 높은 생존률을 나타냈고 나머지 group은 큰 차이를 보이지 않았다. 폐사율에서 secretion signal peptide 및 flagellin을 조합한 group은 그렇지 않은 group보다 생존률이 높게 나타났으며, 이것으로 FlaA와 vGsp의 조합으로 항원의 면역원성이 증가하였음을 알 수 있다. 생존률이 높은 pc-VL 및 pc-VLF group은 공통적으로 VHSV glycoprotein의 secretion signal peptide (vGsp)가 달려있는데, secretion signal이 존재함으로써 LRR 단백질이 세포 밖으로 secretion될 수 있으며 따라서 그렇지 않은 pc-L group보다 면역 세포에 잘 인식될 수 있었을 것이라 생각된다. 그리고 cytosol에서 잘려나간 secretion signal peptide 단편이 세포 내에서 calmodulin 또는 major histocompatibility complex (MHC) class I에 부착함으로써 세포기능 조절에 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다 (Martoglio et al., 1998). 또한 flagellin은 다양한 이미 다양한 형태의 백신에서 adjuvant로 사용되고 있는데, 초기 면역반응의 중요한 요소인 toll-like receptor 5 (TLR5)에 flagellin이 부착함으로써 MyD88-dependent pathway를 자극함으로써 면역반응이 유도되었을 것이라 생각되며 (Gupta et al., 2014), 이러한 측면에서 보았을 때 vGsp의 사용이 넙치에 긍정적인 영향을 미쳤을 것이라 생각된다.

본 연구의 1장에서는 체표 기생충인 *M. avidus*에 대한 항원을 기반으로 molecular adjuvant와 연결하여 여러 조합의 DNA 백신을 시도하였으며,

공격 실험에서 항원과 molecular adjuvant를 연결함으로써 방어효과가 증가하였음을 확인하였다. 따라서 추후 이러한 숙주의 면역 반응을 유도하는 항원들의 작용 메커니즘에 대한 연구가 더 필요하다. 또한 바이러스성 질병의 경우 숙주 체내에 systemic하게 감염되어 조직 또는 기관에 증상을 나타내는 반면, 기생충성 질병은 특정 조직 또는 기관에 감염되어 증상을 나타내기 때문에 DNA 백신으로 효과적으로 targeting하기 힘들다 (Louise et al., 2012). 따라서 체내에서의 전신적인 면역뿐만 아니라 체표면역도 함께 자극할 필요가 있으며, 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.



제 2 장

넙치의 바이러스성 출혈성 패혈증에
대한 DNA 백신의 방어 효과

I. 서론

DNA 백신은 외부 항원 유전자를 plasmid에 삽입하여 숙주 내에서 유전자를 발현시킴으로써 세포성 및 체액성 면역 반응을 동시에 유도할 수 있는 장점이 있다. DNA 백신은 어떤 항원을 선정하느냐에 따라서 그 효과가 결정되는데, 대표적으로 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)와 같은 rhabdovirus의 glycoprotein이 잘 알려진 항원 중 하나이다. VHSV는 *novirhabdovirus* 속의 negative sense single-stranded RNA virus로, genome에 nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non virion protein (NV) 그리고 large polymerase protein (L)의 총 6가지 유전자를 포함하고 있다. 그 중 G protein은 VHSV의 외부에 발현하고 있는 항원으로 이미 많은 선행 연구에 의해 그 효과가 입증되었으며 (Lorenzen et al., 1998; Byon et al., 2005), 현재는 molecular adjuvant를 결합하여 면역원성을 높인 DNA 백신으로 방어 효과를 증진시키고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다 (Lazarte et al., 2017).

MicroRNA (miRNA)는 20-24nt 정도의 작은 non-coding RNA 분자로, hairpin 구조를 가지며 현재까지 miRNA는 동물, 식물, 바이러스 등 다양한 생물에서 발견되었다. 대부분의 miRNA는 핵에서 RNA polymerase II에 의해 전사되며 일련의 성숙 과정을 통해 primary miRNA (pri-miRNA), precursor miRNA (pre-miRNA)를 거쳐 세포질로 나오게 된다. 성숙 miRNA는 세포질에서 RNA-induced silencing complex (RISC)와 결합하여 target mRNA의 3'UTR에 붙어 유전자 발현을 조절한다. MiR-155는 숙주의 면역에 관련하여 잘 알려진 miRNA 중 하나로 혈액 생성, 염증 반응 및 항상성 등과 관련된 역할을 하며 B 림프구와 T 림프구의 분화 및

활성에 필수적이다 (Li et al., 2013; Rodriguez et al., 2007). 또한 바이러스 감염에 있어서 면역 반응의 다양한 pathway를 통하여 바이러스 증식을 억제 또는 조절한다고 알려져 있다 (Pareek et al., 2014; Wang et al., 2010). 또한 선행 연구에서 넙치에 VHSV를 감염시켰을 때 miR-155가 24시간 이후 발현량이 증가함을 확인하였으며 (Najib et al., 2016), 넙치 치어에 miR-155를 발현하는 vector를 주사하였을 때 type I interferon 반응이 증가함으로써 항 바이러스성 기능의 가능성을 제시하였다 (Najib et al., 2018). 따라서 본 연구에서는 miR-155를 molecular adjuvant로 사용하여, VHSV G gene과 동일한 vector에서 발현되도록 하여 항 바이러스성 작용을 기대하였으며 면역 반응을 효과적으로 유도하고자 하였다. 또한 VHSV와 같은 rhabdovirus인 hiram rhabdovirus (HIRRV)에 대해서도 혈청 분석을 실시함으로써, miR-155가 초기 면역 반응에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포, 바이러스 및 실험어

실험에 사용한 세포는 *Epitheloma papulosum cyprini* (EPC)(ATCC CRL-2872) cell로, american type culture collection (ATCC)에서 구매하였다. 세포는 Leibovitz's L-15 medium (L-15, sigma)에 10 % fetal bovine serum (FBS, WELGENE)과 1 % penicillin-streptomycin (Pen Strep, WELGENE)을 첨가한 배지를 사용하여 28℃에서 배양하였고, 배지는 3일간격으로 교체해 주었다.

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 2008년 경남 소재 양식장에서 분리한 VHSV KJ2008 strain (GeneBank: JF792424.1)을 사용하였다. HIRRV rhabdovirus (HIRRV)는 2005년에 넙치에서 분리한 HIRRV CA9703 strain (GeneBank: NC_005093.1)을 사용하였다. Virus 감염 시에는 1 % Pen Strep을 첨가하고 FBS는 첨가하지 않은 L-15 배지를 사용하였다.

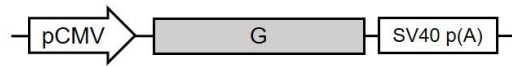
실험어인 넙치는 부산광역시 강서구 명지동의 수산자원연구소와 전라남도 영광군 염산면의 유일수산에서 운반하여 왔으며, 평균 전장은 각각 7.76 ± 1 cm, 7.36 ± 1 cm 이고 평균 체중은 각각 2.94 ± 1 g, 3.62 ± 1 g (n=10) 이다. 운반 후 7일간 20℃에서 순치하였으며, 병원체 감염 여부를 확인하기 위하여 기생충, 세균 그리고 바이러스 검사를 진행하여 음성을 확인한 후 실험을 진행하였다.

2. Vector 제작

VHSV의 glycoprotein (G) 유전자의 open reading frame (ORF) 전체를 증폭하기 위하여 Age I 과 HindIII enzyme site와 kozak sequence를 포함하는 primer를 디자인하였으며 (Table 2-1), PCR로 증폭한 후 pGEM-T easy vector (Promega)에 cloning 하였다. Cloning한 유전자는 Age I -HindIII 제한효소를 처리하여 pFC vector (System Bioscience, Korea)에 삽입하였다. 완성된 vector는 sequence를 모두 확인하였으며 (Macrogen sequencing service, Korea) pFC-vG라 명명하였다.

선행 연구에서 NCBI 데이터를 기반으로 flanking region을 양쪽 각각 100bp씩 포함하는 zebrafish primary miR-155 (pri-miR-155)를 cloning하여 cytomegalovirus (CMV) promoter로 발현하는 plasmid를 제작하였고 (Najib et al., 2018), 본 실험의 molecular adjuvant로 이용하였다. pri-miR-155를 발현하는 cassette 전체를 cloning하기 위하여 SacII와 EcoR I enzyme site를 포함하는 primer를 디자인하여 PCR로 증폭하였다 (Table 2-2). 증폭한 pri-miR-155 발현 cassette는 gel extraction 후 pGEM-T easy vector에 cloning하였으며, SacII-EcoR I 제한효소를 처리하여 pFC-vG의 G 유전자 발현 cassette 뒤에 삽입하였다. 완성된 vector는 sequence를 모두 확인하였으며 pFC-vG-miR155라 명명하였다 (Fig 2-1).

A. pFC-vG



B. pFC-vG-miR155

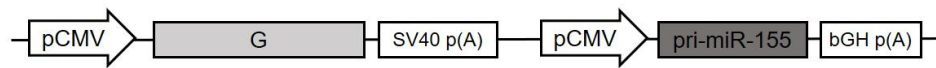
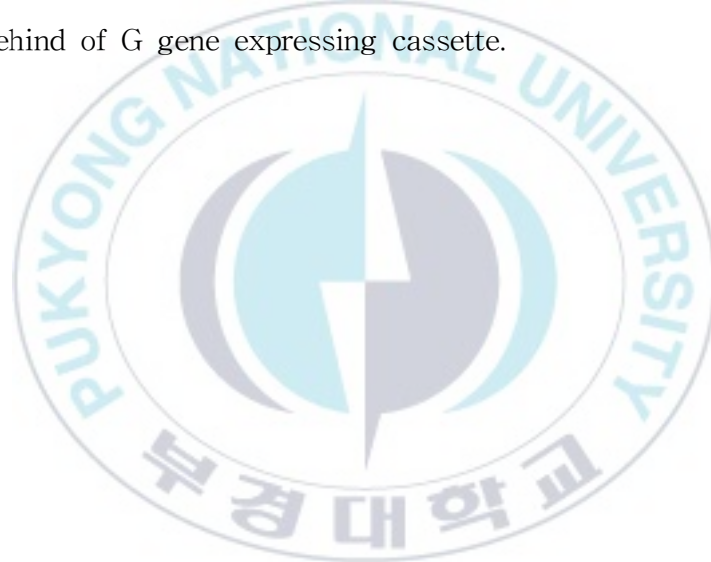


Fig 2-1. Construction of VHSV DNA vaccine. **(A)** VHSV G gene was inserted in pFC vector. **(B)** pri-miR-155 expressing cassette was inserted behind of G gene expressing cassette.



3. *In vitro*에서 miR-155 발현 확인

In vitro 상에서 miR-155의 발현을 확인하기 위하여, pFC-vG-miR155 vector 2 μg 을 35mm dish (SPL life science)에 배양한 EPC 세포에 FuGENE HD transfection reagent (Promega)를 사용하여 3반복으로 형질주입 하였다. 세포는 형질주입 24시간, 48시간 그리고 72시간 후 trizol (RiboEx, GeneAll) 1 ml을 넣어 sampling 하였다. Sample은 Hybrid-RTM miRNA (GeneAll) kit를 사용하여 small RNA를 분리하였고, HB miR Multi Assay KitTM system II (HeimBiotek, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA는 reference gene인 U6와 miR-155에 대한 specific RT primer를 디자인하여 36°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 PCR하여 각각 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20°C에서 보관하였으며, 그 중 2 μl 를 다음의 조건으로 Roche Light Cycler 480 (Roche)에서 real-time PCR을 시행하였다 (preincubation hold 95°C 15분, amplification 95°C 10초, 60°C 40초, 총 40 cycle). Real-time PCR의 결과는 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 방법으로 계산하여 분석하였다.

4. *In vivo* 실험

가. 1st experiment (10 μg of plasmids)

수산자원연구소에서 운반해 온 넙치에 DNA 백신을 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사하기 위하여, 각각의 vector를 phosphate-buffered saline (PBS)로 희석하여 group 당 50마리씩 근육 주사하였고, control group은 PBS와 pFC

empty vector를 각각 주사하였다. 주사 3일, 7일, 14일 그리고 28일 이후 3마리씩 채혈하여 4℃에서 8000rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. DNA 백신 주사 28일 이후 VHSV 10^2 pfu/fish, 10^3 pfu/fish 농도로 group 당 12마리씩 근육 내 주사하였다. 실험 중 폐사한 넙치는 즉시 수조에서 건졌으며, 폐사는 3주간 관찰하였다.

나. 2nd experiment (1 μ g of plasmids)

유일수산에서 운반해 온 넙치에 DNA 백신을 1 μ g/fish 농도로 주사하기 위하여, 각각의 vector를 phosphate-buffered saline (PBS)로 희석하여 group 당 30마리씩 근육 주사하였고, control group은 PBS와 pFC empty vector를 각각 주사하였다. DNA 백신 주사 28일 이후 채혈하여 혈청을 분리하였으며, VHSV 5×10^3 pfu/fish, 5×10^4 pfu/fish 농도로 group 당 11마리씩 근육 내 주사하였다. 모든 group은 반복구를 두었으며, 실험 중 폐사한 넙치는 즉시 수조에서 건졌으며, 폐사는 2주간 관찰하였다.

5. Serum virucidal activity

DNA 백신 10 μ g/fish 주사 후 3일, 7일, 14일 그리고 28일째에 넙치에서 분리한 혈청은 항생제가 첨가된 L-15 배지로 10배 희석한 후, 96-well round-bottomed plate (SPL life science)에서 60 μ l씩 단계 희석하였다 (1/20-1/2560). VHSV와 HIRRV 바이러스는 각각 항생제가 첨가된 L-15 배지에 10^3 PFU 농도로 희석하여 60 μ l씩 추가하였으며 4℃에서 1시간동

안 반응하였다. EPC cell은 96-well flat-bottomed plate (SPL life science)에서 7×10^4 cells/well만큼 배양하였으며 28℃, 20℃ 그리고 15℃로 하루 간격으로 온도를 낮추어 순치하였다. 혈청과 반응한 바이러스는 최종적으로 순치한 EPC cell에 추가하여 15℃에서 반응하였으며, 10일간 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다.

6. Serum neutralization test

DNA 백신 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 및 1 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 주사 28일 후 넙치에서 분리한 혈청은 56℃에서 30분간 heat-inactivation하여 보체를 불활화 하였고, 항생제가 첨가된 L-15 배지로 10배 희석하였다. 모든 혈청에 불활화하지 않은 control 혈청을 1:1로 섞어 개체 간 보체의 양을 같게 맞춰주고, 그 후 96-well round-bottomed plate에서 60 μl 씩 단계 희석하였다 (1/40-1/5120). VHSV와 HIRRV 바이러스는 각각 항생제가 첨가된 L-15 배지에 10^3 PFU 농도로 희석하여 60 μl 씩 추가하였다. 96-well round-bottomed plate는 4℃에서 1시간동안 반응하였으며, 96-well flat-bottomed plate에서 7×10^4 cells/well만큼 배양하여 15℃로 순치해둔 EPC cell에 추가하였다. 96-well flat-bottomed plate는 15℃에서 반응하였으며, 10일간 CPE를 관찰하였다.

7. 통계 분석

Real-time PCR을 통한 miR-155 발현 분석 실험에서의 시간대별

miR-155 발현 유의차는 Student's t-test를 통해 검정하였다. Serum virucidal activity 및 neutralization test 실험에서 group 간 수치의 유의차는 Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA)를 통해 검정하였다. 모든 통계 분석은 SigmaPlot 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) 프로그램을 사용하였다.



Table 2. Summary of primer used in this study

2-1. For construction of pFC-vG vector

Name	Sequence (5'-3')
vG_kozak_Age I _F	ACCGGT GCCACCATGGAATGGAATACTTTTTTCT TGGTGATTCTGG
vG_HindIII_R	AAGCTT TCAGACCATCTGGCTTCTGGAGAAC

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)
(Shading nucleotides indicates kozak sequence)

2-2. For construction of pFC-vG-miR155 vector

Name	Sequence (5'-3')
CMV_Sac II _F	CCGCGG GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT
bGH_EcoR I _R	GAATT CCCATAGAGCCCACCGCATCC

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

Ⅲ. 결 과

1. *In vitro*에서 miR-155 발현 확인

*In vitro*에서 pFC-vG-miR155 vector에서의 miR-155 발현을 확인하기 위하여, EPC 세포에 plasmid 2 μ g을 형질 주입하여 24, 48 그리고 72시간 후 real-time RT-PCR을 통하여 miR-155의 발현량을 확인하였다. Internal control로 U6를 사용하여 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법으로 계산하였을 때, 각 시간대에서 mock control cell에 비해 miR-155가 잘 발현됨을 확인할 수 있었다. EPC 세포에 형질주입 24시간 후 miR-155의 발현량이 약 8배 증가하였으며 48 시간 후에는 17배까지 증가하였으나, 72시간 후에는 다시 7배로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig 2-2).

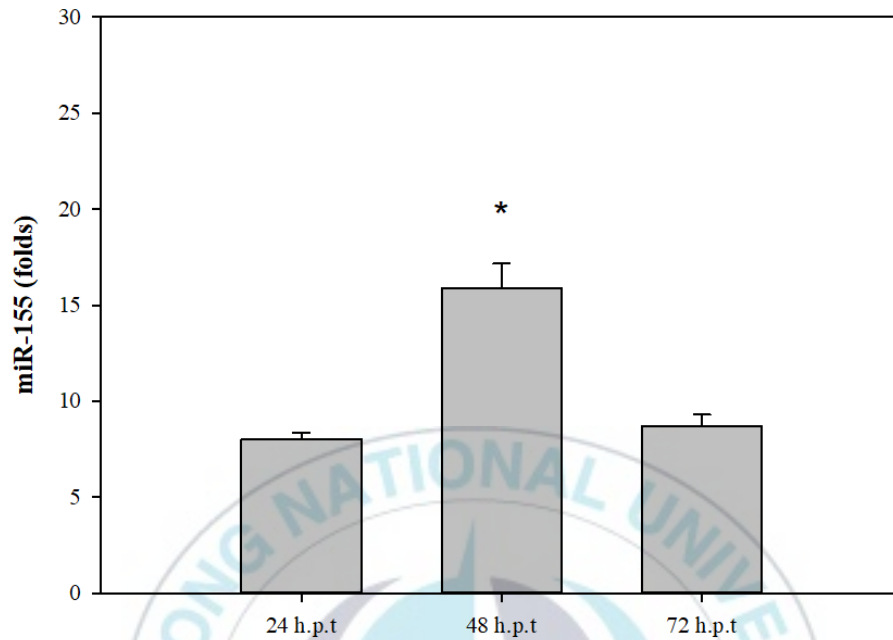


Fig 2-2. Quantification of miR-155 in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells using real-time RT-PCR. EPC cell was transfected with pFC-vG-miR155 plasmids and sampled 24, 48 and 72 hours post-transfection (h.p.t). The miR-155 expression level was compared with mock control cell and U6 gene was used with internal control. Asterisk indicate the statistical significance from 24 h.p.t, $p < 0.05$ (*).

2. *In vivo* 실험

DNA 백신을 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사하고 28일 이후 VHSV 10^2 pfu/fish, 10^3 pfu/fish 농도로 group 당 12마리씩 근육 주사 하였으며, 3주간 폐사를 관찰하였다. 실험 결과, 10^2 pfu/fish 농도로 challenge한 group은 VHSV 주사 후 5일부터 폐사가 점진적으로 나타났다. PBS 및 pFC group은 65 % 이상의 폐사율을 보였고, pFC-vG 및 pFC-vG-miR155 group에서는 폐사가 나타나지 않았다. 10^3 pfu/fish 농도로 challenge한 group은 VHSV 주사 후 3일부터 폐사가 점진적으로 나타났다. PBS 및 pFC group은 각각 66.7 %, 83.3 %로 낮은 농도로 challenge했을 때 보다 높은 폐사율을 보였다. pFC-vG (16.7 %) 및 pFC-vG-miR155 (8.3 %) group은 주사 후 13일 및 17일째에 폐사가 나타났지만, 더 이상 진행되지 않았다 (Fig 2-3).

DNA 백신을 1 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사하고 28일 이후 VHSV 5×10^3 pfu/fish, 5×10^4 pfu/fish 농도로 group 당 11마리씩 근육 주사 하였으며, 2주간 폐사를 관찰하였다. 실험 결과, 두 가지의 농도로 challenge한 group 모두 3일부터 폐사가 점진적으로 나타났다. PBS와 pFC group 모두 90 % 이상의 폐사율을 나타냈으며, pFC-vG와 pFC-vG-miR155 group은 모두 폐사율이 10 % 이내로 거의 나타나지 않아 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사한 실험과 같은 경향을 나타내었다 (Fig 2-4).

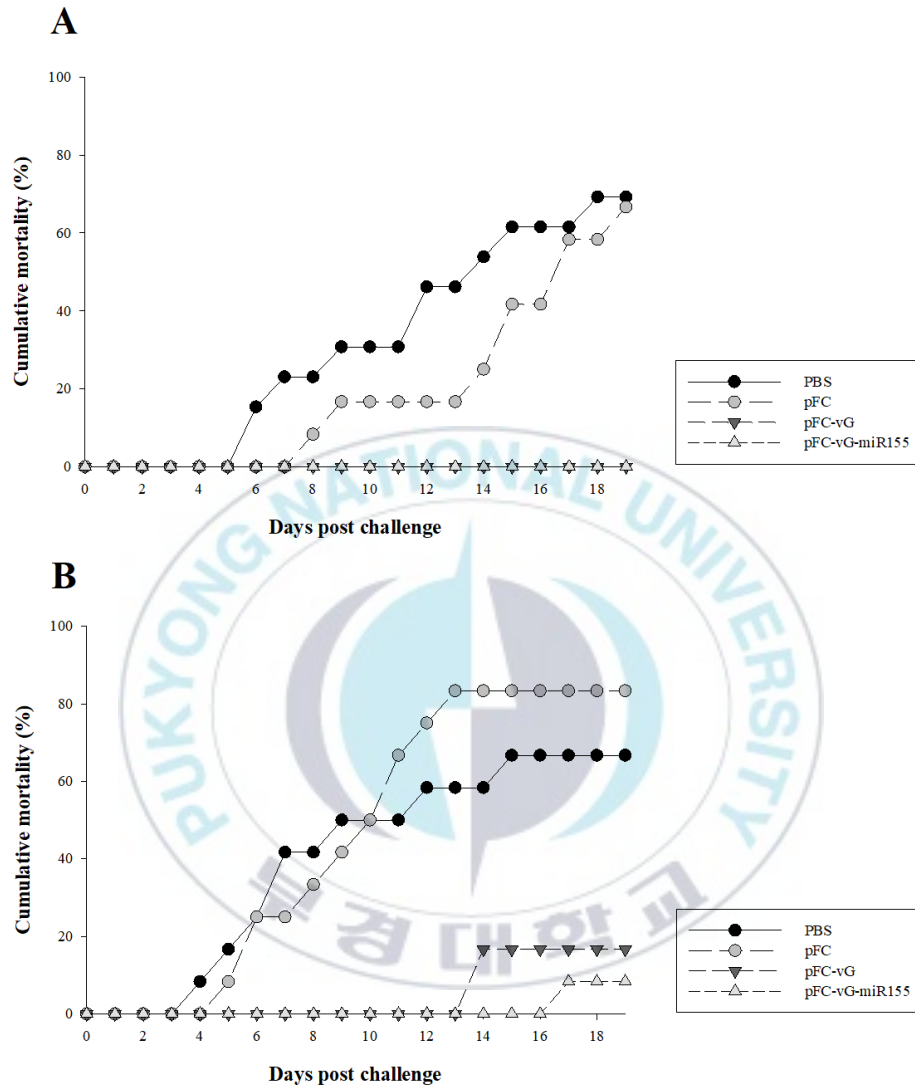


Fig 2-3. Cumulative mortality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with (A) 10^2 pfu/fish and (B) 10^3 pfu/fish of VHSV after immunization with 10 μ g of plasmids and PBS.

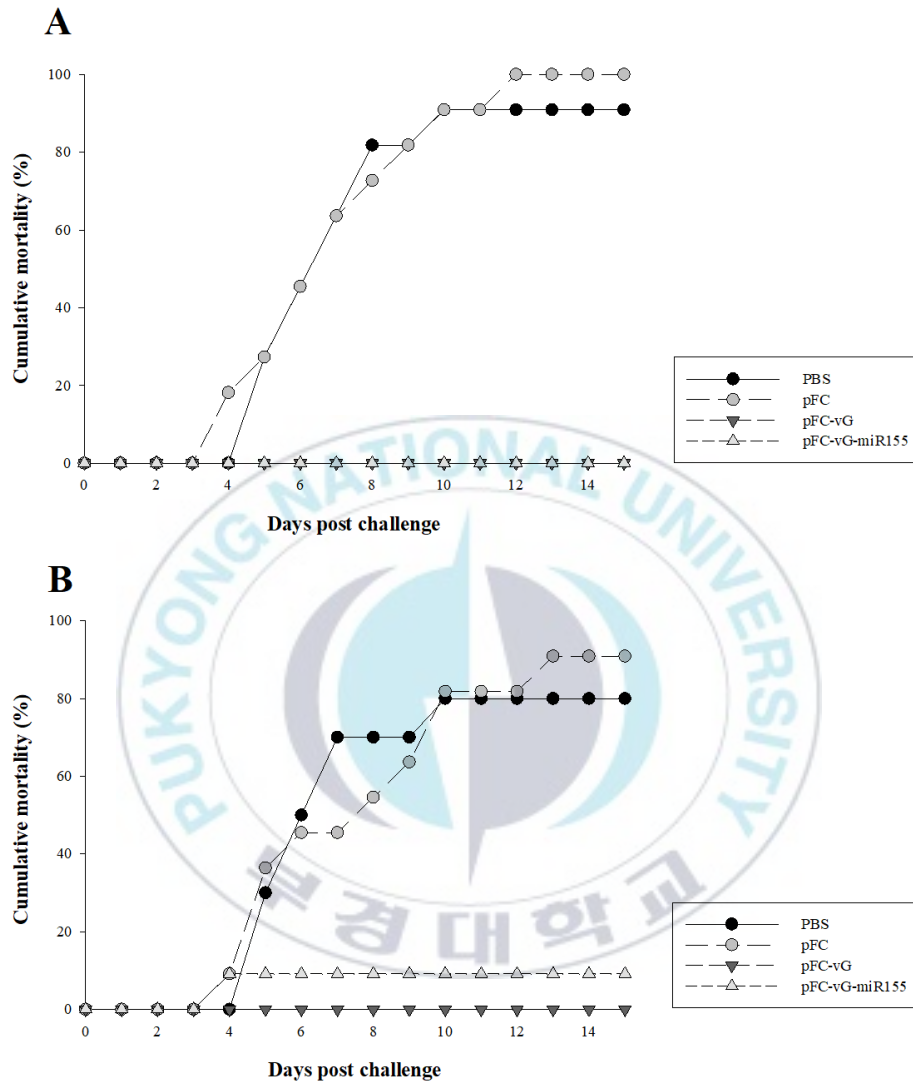


Fig 2-4. Cumulative mortality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with **(A)** 5×10^3 pfu/fish and **(B)** 5×10^4 pfu/fish of VHSV after immunization with 1 μ g of plasmids and PBS.

3. Serum virucidal activity

DNA 백신을 10 μ g/fish 농도로 주사하고 3일, 7일, 14일 그리고 28일 후
넙치에서 분리한 혈청으로 VHSV 및 HIRRV에 대하여 각각 virucidal
activity를 진행하였다. VHSV의 경우, 3일차에서 pFC-vG 및
pFC-vG-miR155 group이 control group에 비해 높은 수치를 나타냈으며,
14일차와 28일차에서 점차 증가하는 경향을 볼 수 있다. 28일차에는 급격
히 수치가 증가하여, pFC-vG 및 pFC-vG-miR155 group에서 각각 PBS
group에 비하여 30배와 24배 높게 나타났다 (Fig 2-5-A).

반면에 HIRRV의 virucidal activity 실험 결과, 3일차에서
pFC-vG-miR155 group만이 PBS group의 3배 높은 수치를 나타냈으며
pFC-vG group은 PBS 및 pFC group과 비슷하였다. 7일, 14일 그리고 28
일차에서는 모든 group이 비슷하게 나타났다 (Fig 2-5-B).

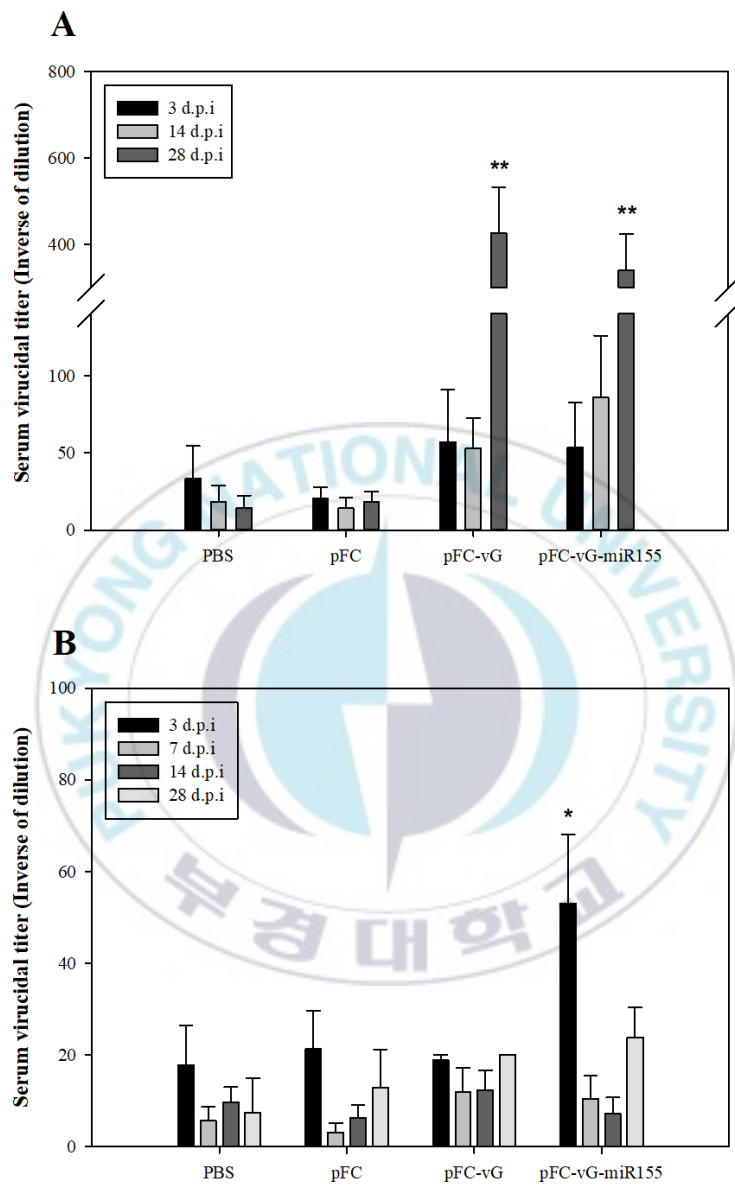
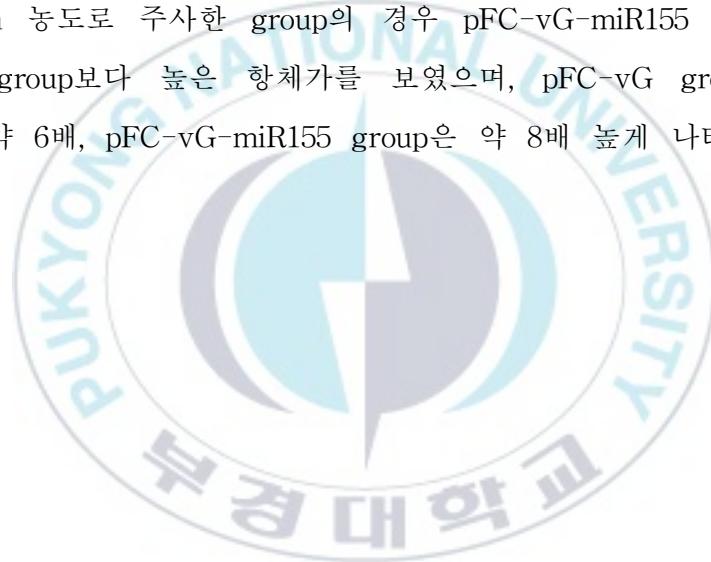


Fig 2-5. Serum virucidal activity against **(A)** VHSV and **(B)** HIRRV with 3, 7, 14 and 28 days post immunization (d.p.i). Asterisks indicate the statistical significance from the control group, $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**).

4. Serum neutralization test

DNA 백신을 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 및 1 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사하고 28일 후 넙치에서 분리한 혈청으로 neutralization test를 진행하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사한 group의 VHSV에 대한 항체가는 pFC-vG와 pFC-vG-miR155 group이 서로 비슷한 수치를 나타냈으며 PBS group의 약 15배, pFC group의 약 6배정도 높게 나타났다 (Fig 2-6-A).

1 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 농도로 주사한 group의 경우 pFC-vG-miR155 group의 이 pFC-vG group보다 높은 항체가를 보였으며, pFC-vG group은 PBS group의 약 6배, pFC-vG-miR155 group은 약 8배 높게 나타났다. (Fig 2-6-B)



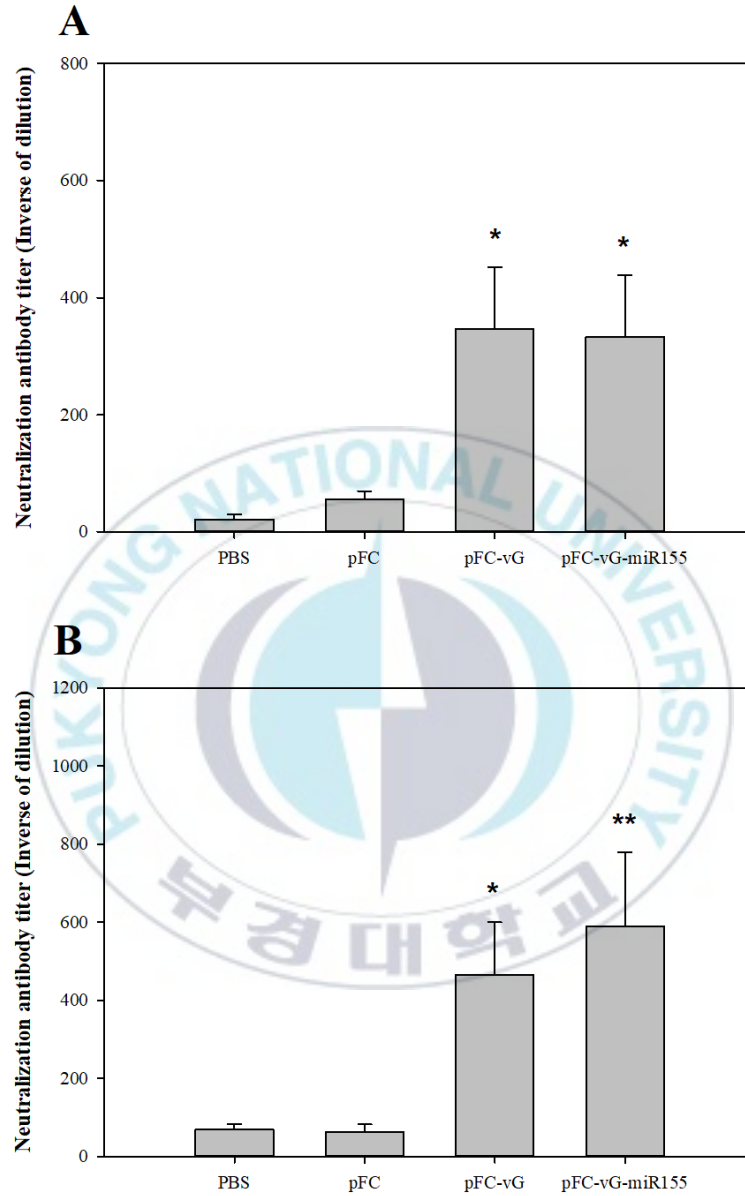


Fig 2-6. Serum neutralization test against VHSV with 4 weeks post immunization (w.p.i). The serum was isolated from **(A)** 10 μ g and **(B)** 1 μ g of plasmids and PBS injected olive flounder. Asterisks indicate the statistical significance from the control group, $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**).

IV. 고 찰

본 연구에서는 VHSV의 glycoprotein을 항원으로 하는 DNA 백신 vector를 제작하였으며, 넙치의 miR-155를 사용하여 molecular adjuvant로서의 효과를 보고자 하였다. *In vivo* 실험에 사용된 pFC-vG-miR155 vector를 EPC 세포에 형질 주입하여 miR-155의 발현 여부를 real-time RT-PCR로 확인하였다. 제작한 DNA 백신을 넙치 치어에 마리 당 10 μ g 및 1 μ g씩 immunization 한 후 두 농도의 VHSV로 공격실험을 진행하였을 때, 모든 그룹에서 폐사가 거의 일어나지 않을 정도로 방어효과가 뛰어났다. DNA 백신의 효과는 백신의 주사 방법과 숙주의 크기 및 종류에 따라 다를 수 있는데, 본 연구에서 사용된 넙치 치어는 제작한 DNA 백신 1 μ g을 근육 주사 하였을 때 충분히 VHSV에 대해 방어를 할 수 있었다. VHSV의 G gene을 항원으로 한 DNA 백신 1 μ g을 복강 주사 하였을 때에도 병원체를 막아주는 것이 보고된 바 있으며 (Lazarte et al., 2017), 같은 rhabdovirus인 infectious hematohietic necrosis virus (IHNV)에 대한 glycoprotein DNA 백신의 경우 0.01 μ g의 농도에서도 무지개송어에서 방어 효과를 나타낸 것으로 알려져 있다 (Corbeil et al., 2000). 따라서 본 실험의 결과에서도 알려진 바와 같이 VHSV의 glycoprotein의 항원성이 넙치에서 매우 뛰어남을 확인할 수 있었다.

10 μ g의 DNA 백신을 주사한 후 3일, 7일, 14일 그리고 28일째에 분리한 혈청으로 VHSV 및 HIRRV에 대한 virucidal activity를 진행하였다. VHSV에 대한 virucidal activity의 결과에서, pFC-vG 및 pFC-vG-miR155 group은 immunization 후 3일차에 초기 면역 반응으로 control group에 비해 높은 수치를 나타낸 것으로 생각되며 시간이 갈수록 체액성 면역 반응

이 증가함으로써 점점 수치가 높아지는 경향을 나타낸 것으로 생각된다. HIRRV에 대한 virucidal activity의 결과에서는 VHSV의 glycoprotein에 대한 백신임에도 불구하고 3일차에 pFC-vG-miR155 group이 높은 수치를 나타냈는데, 이는 miR-155가 초기 면역 반응에 관여했기 때문으로 추측된다. 사람에서는 miR-155가 macrophage의 분포도 및 dendritic cell의 maturation를 조절하며, 초기 세포활성 등에 대한 inhibitor의 mRNA를 target으로 함으로써 염증 반응을 유도한다고 알려져 있다 (Alivernini et al., 2017). 또한 miRNA가 관여하는 RNA interference는 매우 다양한 척추동물의 초기 항 바이러스성 면역에 중요한 역할을 할 수 있다고 한다 (Bela-ong et al., 2015). 따라서 miR-155가 Type I interferon을 자극하여 초기 면역이 활성화되고, 비특이적인 면역 반응이 나타났을 것이라 생각된다.

10 μ g 및 1 μ g의 DNA 백신을 주사한 후 28일째에 분리한 혈청으로 VHSV에 대한 neutralization test를 진행하였으며, 그 결과 두 실험 모두 VHSV에 대한 중화 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 체액성 면역 반응이 효과적으로 유도되었으며, 앞선 누적폐사율의 결과와 같이 VHSV의 감염에 대해 저항성을 가진다고 할 수 있다.

본 연구의 2장에서는 VHSV의 glycoprotein을 항원으로 한 DNA 백신을 제작하여 방어 효과를 확인하였으며, miR-155를 molecular adjuvant로 사용함으로써 non-specific하게 초기 면역 반응을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 miR-155가 항 바이러스성 작용을 일으킴으로써 나타나는 숙주 내 면역 유전자의 변화를 분석하여, 그 기능을 자세히 연구할 필요가 있다. 또한 DNA백신을 1 μ g의 소량으로 주사하였을 때에도 효과가 뛰어났으며, 추후의 연구를 통해 plasmid의 농도에 따른 효과를 확인할 필요가 있다고 생각된다.

제 3 장

VHSV에 대한 minicircle DNA 백신 제작 및 분석



I. 서론

DNA 백신은 세포성 및 체액성 면역 반응을 모두 유도하고 다른 백신에 비해 제작이 비교적 쉬우며 보관이 용이하다는 장점이 있지만, 이에 따른 백신의 여러 가지 안정성 문제 또한 제기되고 있다. Plasmid를 제작하며 세균 내에서 대량으로 얻기 위해서는 replication origin 및 selection marker 등의 bacterial element가 필요하며, 백신으로 사용되는 plasmid에서 selection marker로 주로 사용되는 항생제 내성 유전자의 사용은 제한되어 있다 (FDA, 1998). 최근에는 항생제 내성 유전자 대신 사용할 수 있는 여러 가지 방법들이 제시되었는데 (Vandermeulen et al., 2011), 본 연구에서는 이러한 방법 중 하나인 minicircle DNA를 제작하여 사용하였다.

Minicircle DNA는 외래 유전자를 발현할 수 있는 최소한의 구성 요소로 이루어진 DNA로, plasmid에 존재하는 replication origin 및 항생제 내성 유전자가 포함되어있지 않다. 따라서 DNA 백신으로써의 안정성을 높였으며, 일반적인 plasmid에 비해 size가 줄어들어 따라 같은 농도에서 더 많은 copy 수가 들어가 효과적이다. 또한 세포 내에서의 유전자 발현 지속성을 높일 수 있으며, 이외에도 plasmid와 minicircle DNA를 비교하였을 때 효과적이었다는 다양한 연구결과가 존재 한다 (Chen et al., 2003; Zhao et al., 2011; Cantanese et al., 2012; Dietz et al., 2013; Stenler et al., 2014). 본 연구에서는 재조합 세균 내에서 parental plasmid의 recombination을 유도하여 다량의 minicircle DNA를 얻고자 하였으며, zebrafish에 같은 외래 유전자 발현 cassette를 가지는 plasmid와 minicircle DNA를 주사하였을 때 체내에서의 plasmid persistence를 분석하여 얼마나 지속적으로 면역 반응을 유도할 수 있는지를 확인하기 위해 실험을 진행하였다.

Novirhabdovirus 속의 negative sense single-stranded RNA virus인 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non virion protein (NV) 그리고 large polymerase protein (L)의 총 6가지 유전자로 genome이 구성되어 있으며, matrix protein과 glycoprotein을 항원으로 실험에 사용하였다. Matrix protein은 rhabdovirus 내에서도 다양한 역할을 한다고 알려져 있으며 (Ke et al., 2017), 숙주의 유전자 발현을 억제시키며 숙주 세포의 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다 (Chiou et al., 2000). 본 연구에서는 DNA 백신에 G와 M 유전자를 각각 발현하는 cassette와 동시에 발현하는 cassette를 삽입하여 숙주 세포의 apoptosis를 유도하였으며, plasmid 및 minicircle DNA가 apoptosis 시 세포 내에서 오래 잔류하지 않도록 하여 안정성을 높인 DNA 백신을 개발하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세균 및 실험어

실험에 사용된 minicircle DNA 생산 균주는 arabinose-inducible promoter에 의해 ϕ C31-integrase 및 I-SceI endonuclease를 발현하는 ZYCY10P3S2T *Escherichia coli* (System Biosciences)를 사용하였다. 세균 subculture 시 TB medium (1.2 % tryptone, 2.4 % yeast extract, 0.5 % glycerol)과 10x TB salts (0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4)를 9:1로 섞은 Terrific Broth(TB) 배지를 사용하였다. 세균은 형질 전환하는 vector의 항생제 내성 유전자에 따라서 kanamycin (sigma)을 배지에 첨가하여 배양하였다.

실험어인 zebrafish는 부산광역시 사상구 주례동의 못골수족관에서 분양 받았으며 평균 전장 3.9 ± 1 cm, 체중 0.49 ± 0.3 g (n=10) 이다. 실험어는 운반 후 2주간 순치하였으며, 28℃에서 실험을 진행하였다.

2. Minicircle DNA 제작

가. Parental plasmid 제작

본 연구에서는 viral hemorrhagic septicemia virus KJ2008 strain

(GeneBank: JF792424.1)의 glycoprotein (G) 과 matrix protein (M) 유전자를 포함한 minicircle DNA를 제작하고자 하였다. 선행연구에서 VHSV의 G 와 M 유전자를 pFC vector (System Bioscience, Korea)를 backbone으로 cytomegalovirus (CMV) promoter로 발현하는 각각의 plasmid를 제작하였고 (Kim et al., 2011), CMV promoter부터 simian virus 40 (SV40) poly(A) signal까지의 발현 cassette를 실험에 사용하였다. 또한 G 와 M 유전자 각각의 cassette를 하나의 parental plasmid에 삽입하기 위하여, M-SV40, pCMV-G를 각각 Nhe I -AflII, Kpn2 I -EcoR I 의 enzyme site를 포함하도록 증폭하여 pFC vector의 pCMV-SV40 사이에 삽입하였다 (Table 3-1). 그리고 EGFP를 insert control로 사용하기 위하여, pFC vector에 AflII-EcoR I 으로 삽입하였다. G, M, M과 G 그리고 EGFP 유전자를 포함하는 각각의 cassette는 32x I-SceI sites, attB/P site를 포함하는 pAi14-luc-MC plasmid (Addgene)에 15-20 bp 정도 겹치도록 overhang을 만들어 primer를 디자인하였고, template를 PCR한 후 overlap cloner (Elpis)로 37°C에서 1시간동안 반응하여 *E. coli* DH5α competent cell에 형질전환 하였다. 형질 전환된 각각의 세균은 kanamycin 항생제를 50 µg/ml 농도로 첨가한 배지에서 selection 하였으며, PCR을 통하여 band size를 확인하였다. 최종적으로 완성된 각각의 parental plasmid들은 sequence를 모두 확인하였으며 (Macrogen sequencing service, Korea), 각각 pMC-G, pMC-M, pMC-MG 그리고 pMC-EGFP 라고 명명하였다 (Fig 3-1).

나. 세균 내에서의 minicircle DNA 형성 유도

세균 내에서 minicircle DNA를 만들기 위하여, parental plasmid 1 µl를 ZYCY10P3S2T *E. coli* minicircle producer strain에 형질 전환하여

kanamycin 항생제를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가한 Luria-Bertani medium (LB, Difco) agar에 selection하였다. 자라난 colony는 kanamycin을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함하는 LB broth 2 ml에 picking하여 30°C에서 200 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. 1 L 용량의 삼각 플라스크에 kanamycin 항생제를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함하는 Terrific broth (TB) 200 ml를 넣고 세균 배양액을 50 μl subculture 후, 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀ 흡광도 측정값이 4에서 6 사이이고 pH가 6.5 이상일 때, LB broth 200 ml에 1 N NaOH 8 ml, 20 % L-Arabinose (Sigma) 200 μl 를 넣고 항생제를 첨가하지 않은 minicircle induction media를 배양액에 섞어 주었다. 32°C에서 250 rpm으로 4시간, 37°C에서 250 rpm으로 1시간동안 induction한 배양액은 4°C에서 4500 rpm으로 10분 간 원심분리하고, pellet을 제외한 상층액을 모두 제거하였다. 그리고 DokDo-Prep plasmid mini-prep kit (Elpis)를 사용하여 pellet에 buffer의 양을 2배로 넣어 DNA를 분리하였다. 분리한 minicircle DNA에 bacterial backbone에만 존재하는 unique restriction enzyme을 각각 처리한 후, plasmid-safe ATP-dependent DNase (Epicentre) 100 U을 처리하여 남아있는 chromosomal DNA 및 parental plasmid를 모두 제거하였다. 최종적으로 만들어진 minicircle DNA는 Gmc, Mmc, MGmc 그리고 EGFPmc라고 명명하였다.

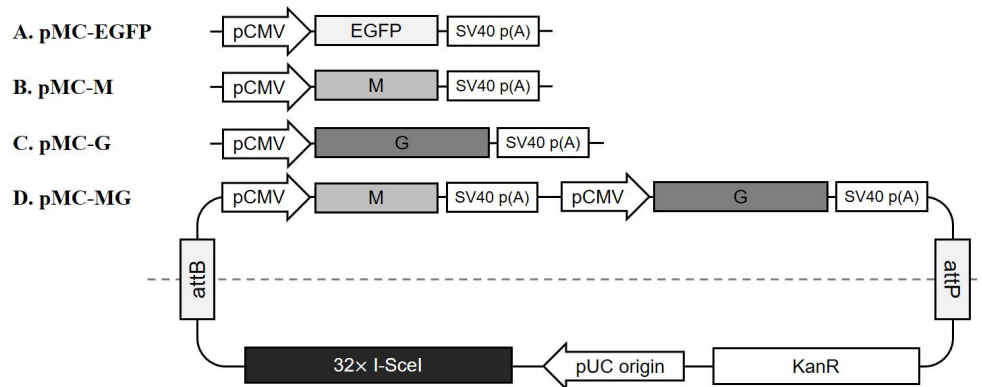


Fig 3-1. Construction of parental plasmid for minicircle DNA. **(A)** VHSV G gene was inserted in pFC vector. **(B)** pri-miR-155 expressing cassette was inserted behind of G gene expressing cassette.

3. Plasmid persistence 분석

가. Zebrafish 내에 근육 주사

Zebrafish 내에서 항생제 내성을 포함하는 plasmid 및 그렇지 않은 minicircle DNA의 persistence를 분석하기 위하여, 각각의 vector를 1 μ g /fish 농도로 phosphate-buffered saline (PBS)로 희석하여 group 당 12마리씩 근육 주사하였고, control group은 PBS를 주사하였다. Zebrafish 주사 1주, 4주, 6주 그리고 8주 후 group 당 3마리씩 주사 부위의 근육을 sampling하였으며, -80°C 에 보관하였다.

나. Genomic DNA 분리 및 real-time PCR

Genomic DNA는 High Pure PCR Template Preparation Kit를 사용하여 분리하였으며, 조직의 무게를 모두 잰 후 kit 내의 tissue lysis buffer 200 μ l와 protease K 40 μ l를 sample에 넣어 55°C 에서 하루 동안 lysis 시켰다. Genomic DNA는 100 μ l로 elution하여 5 μ l를 real-time PCR에 사용하였다. Real-time PCR은 각 plasmid의 ORF를 target으로 하는 primer (Table 3-2)를 디자인하여 절대정량 하였으며, Roche Light Cycler 480 (Roche)을 사용하여 다음의 조건으로 real-time PCR을 시행하였다 (preincubation hold 95°C 15분, amplification 95°C 10초, 60°C 10초, 72°C 20초, 총 40 cycle). Plasmid의 copy number는 각 plasmid ORF의 PCR target이 포함된 plasmid를 standard template로 다음의 계산법을 통해 계산하였으며, 단계 희석하여 3반복으로 standard curve를 그렸다 (Fig 3-2).

Real-time PCR의 결과는 그려진 standard curve를 토대로 Ct값을 대입하여 sample의 plasmid copy number를 산출하였으며, sample 조직의 mg 무게 당 copy 수를 계산하여 비교 분석하였다 (Fig 3-3).

$$\text{Plasmid copy number (copies/}\mu\text{l)} = \frac{\text{plasmid concentration (g/}\mu\text{l)}}{\text{plasmid DNA size (bp)} \times 660} \times 6.02 \times 10^{23}$$

Fig 3-2. Formula for plasmid copy number calculation. Plasmid copy number was calculated for each standard template.



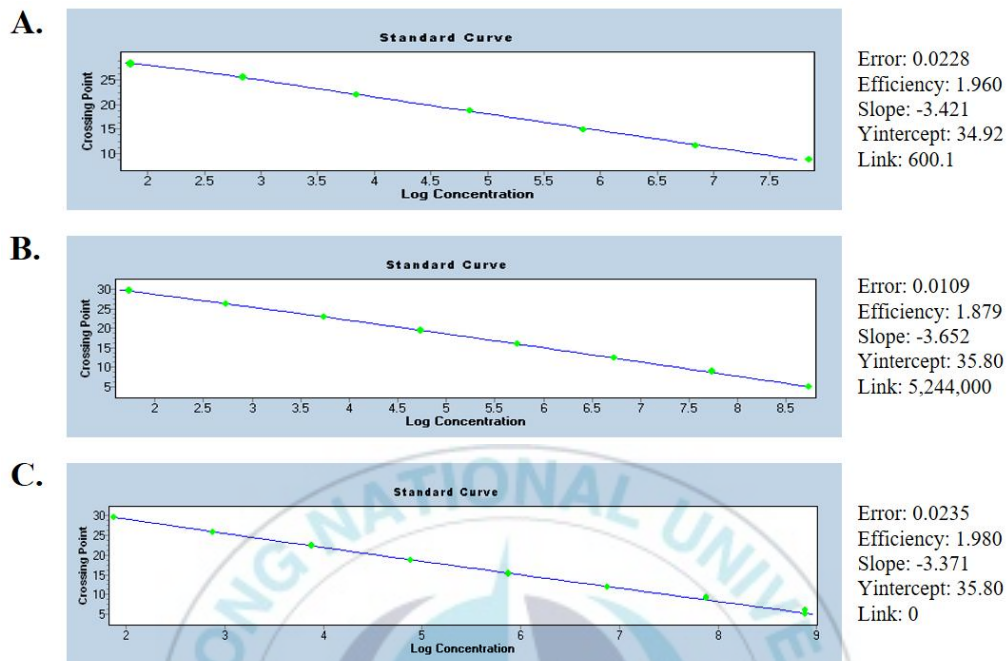


Fig 3-3. Standard curve for plasmid and minicircle DNA copy number calculation. (A) pMC-EGFP was used as standard template. (B) pMC-G was used as standard template. (C) pMC-M was used as standard template.

Table 3. Summary of primer used in this study

3-1. For construction of parental plasmid

Name	Sequence (5'-3')
CMV_enhancer_F	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG
AflII_SV40_R	CTTAAG CAAGCCGAATTGCGTTAAGATACATT G
phiCMV_Kpn2 I_F	TCCGGA GAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG
vG_EcoR I_R	GAATTC TCAGACCATCTGGCTTCTGGAG
EGFP_AflII_F	CTTAAG ATGGTGAGCAAGGGCGAG
EGFP_EcoR I_R	GAATTC TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
pMC_attP_앞쪽_F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAG
pMC_attB_뒷쪽_R	GCGGGCCCTAAGAAGTTCCTCTATAG
attB_phiCMV_OC_F	AACTTCTTAGGGCCCGCATTACGGGGTCATTAG TTCATAGCCC
SV40_attP_OC_R	GGTTGAAGGCTCTCAAGGTTGGGCGCGCCCAAT TTAAATA
pFC-SV40_attP_OC_R	GGTTGAAGGCTCTCAAGCAAGCCGAATTGCGTT AAGATACATTG

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

3-2. For real-time PCR analysis

Name	Sequence (5'-3')
EGFP_realtime_363F	GAACCGCATCGAGCTGAA
EGFP_realtime_474R	TGCTTGTCGGCCATGATATAG
vG_realtime_641F	ATTGCCCTACCTCAGAAACG
vG_realtime_790R	CGGTCTTGATCCATTCTGTCC
vM_realtime_121F	CCAGGAAACCAGGTCGATAAG
vM_realtime_238R	GATCATGGCACTCTGGAATAGG



Ⅲ. 결 과

1. Minicircle DNA 생성 확인

ZYCY10P3S2T *E. coli* 내에서 minicircle DNA induction하여 plasmid-safe ATP-dependant DNase를 처리한 후, 1 % agarose gel에 0.5 μ g씩 loading하여 minicircle DNA의 생성을 확인하였다. Gel 상에서 plasmid 및 minicircle DNA 모두 본래의 size 및 supercoiled form DNA의 두 가지 형태로 나타난 것을 확인할 수 있었다 (Fig 3-4). 정확한 size를 확인하기 위하여 추가적으로 각각의 DNA에 존재하는 unique restriction enzyme을 처리하여 cutting 여부를 확인하였으며, sequence를 모두 확인하였다.

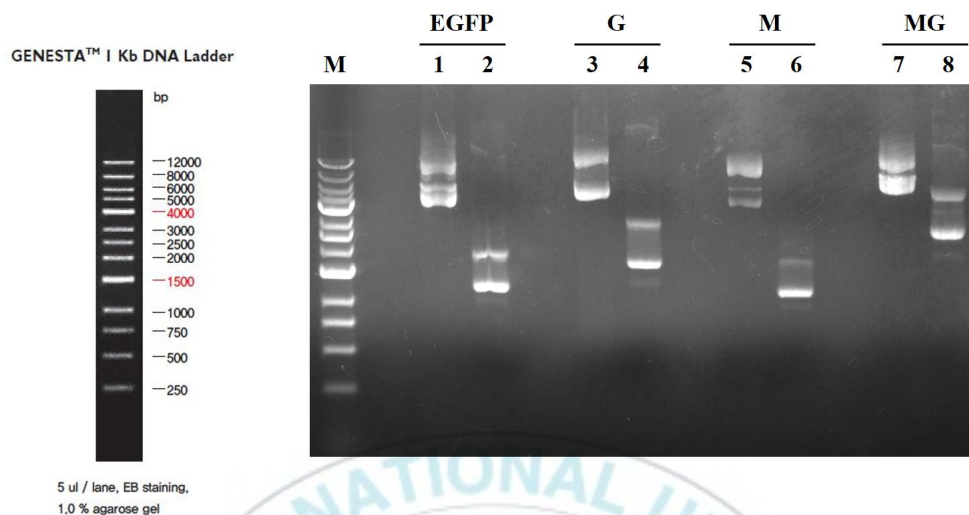


Fig 3-4. Electrophoresis of plasmid and minicircle DNA in 1 % agarose gel. **Lane 1** : pMC-EGFP (5765 bp), **Lane 2** : EGFPmc (1693 bp), **Lane 3** : pMC-G (6565 bp), **Lane 4** : Gmc (2482 bp), **Lane 5** : pMC-M (5563 bp), **Lane 6** : Mmc (1565 bp), **Lane 7** : pMC-MG (8002 bp), **Lane 8** : MGmc (3921 bp)

2. Plasmid persistence 분석

Zebrafish의 근육에 PBS, plasmid 및 minicircle DNA를 주사 후 1, 4, 6 그리고 8주차에 주사 부위에서의 plasmid 및 minicircle DNA copy 수를 비교하였다. 실험 결과, EGFP와 G의 경우 zebrafish 내에서 plasmid보다 minicircle DNA가 더 오래 잔류하는 것을 볼 수 있다. Gmc는 6주차까지도 상대적으로 많은 양이 남아있는 반면 pMC-G는 4주차에도 이미 상당히 소실된 것을 확인할 수 있었다 (Fig 3-5-A, B). 하지만 M과 MG의 경우 전체적으로 EGFP와 G에 비해 copy 수가 낮았고, 1주차에는 Mmc와 MGmc 모두 plasmid에 비해 높은 반면 4주차에는 급격히 감소하여 plasmid와 비슷하거나 더 적게 나타났다 (Fig 3-5-C, D).

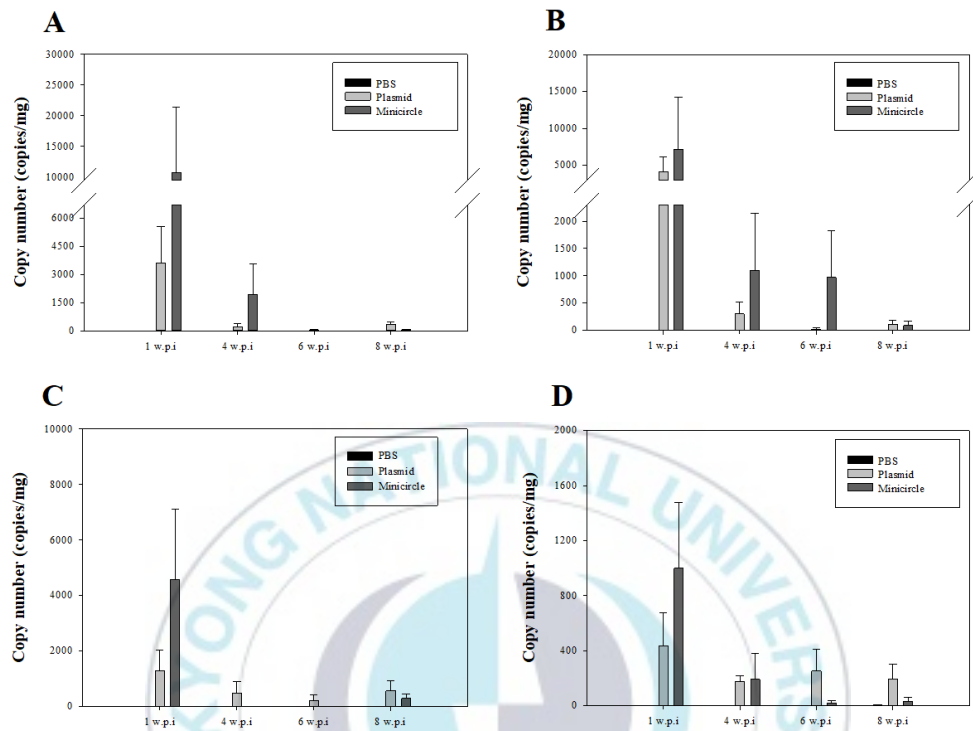


Fig 3-5. Copy number of plasmid and minicircle DNA in 1, 4, 6 and 8 weeks post-immunized (w.p.i) zebrafish's muscle. Copy number was calculated with tissue weight (mg) with standard error bar. **(A)** pMC-EGFP and EGFPmc **(B)** pMC-G and Gmc **(C)** pMC-M and Mmc **(D)** pMC-MG and MGmc. All group was compared with PBS group.

IV. 고 찰

본 연구에서는 arabinose-inducible promoter에 의해 ϕ C31-integrase 및 I-SceI endonuclease를 발현하는 ZYCY10P3S2T *Escherichia coli*를 사용하여 minicircle DNA를 제작하였으며 (Kay et al., 2010), plasmid와 함께 1 % agarose gel에 전기 영동하여 band size를 확인하였다. Agarose gel 상에서 본래의 DNA size를 확인하였으며, 이외에도 size가 더 작은 band를 하나 더 볼 수 있는데 이는 supercoiled 형태의 DNA로 생각된다.

제작된 plasmid 및 minicircle DNA를 1 μ g씩 zebrafish의 근육에 주사하여 시간 경과에 따른 copy 수를 비교 분석하였다. Matrix protein을 발현하지 않는 EGFP와 G group의 경우, minicircle DNA가 plasmid에 비해 오래 지속되는 경향을 나타냈다. 반면에 matrix protein을 발현하는 M과 MG group의 경우 오히려 plasmid가 minicircle DNA에 비해 오래 지속되는 상반된 경향을 나타냈다. Rhabdovirus의 matrix protein은 세포 내에서 apoptosis를 일으키는데 (Kopecky et al., 2003; Kassis et al., 2004), 실험 결과 plasmid와 minicircle DNA 모두 matrix protein을 발현하는데도 불구하고 minicircle DNA가 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 동일 질량의 plasmid와 minicircle DNA를 투여하였을 때 상대적으로 크기가 작은 minicircle DNA는 더 많은 copy 수가 들어가게 되고, 따라서 더 많은 양의 matrix protein이 발현되면서 빠른 속도로 apoptosis가 일어났을 것이라 추측된다. Plasmid와 동일한 분자량 및 질량의 minicircle DNA를 *in vitro*와 *in vivo*에서 유전자 발현을 비교한 연구에 따르면, *in vivo*에서 plasmid와 minicircle DNA를 동일 분자량으로 투여하였을 때 초기 발현량에는 큰 차이가 없었지만 minicircle DNA가 더 오랫동안 지속되었으며, 본 연구와 같

이 동일 질량으로 plasmid와 minicircle DNA를 투여하였을 때에는 6배 이상의 상당한 차이가 나타났다 (Munye et al., 2016). 따라서 이와 같은 결과는 본 연구의 실험 결과를 뒷받침 할 수 있다고 생각된다.

본 연구에서는 DNA 백신에 M 유전자를 삽입한 plasmid 및 minicircle DNA를 제작하여 숙주 세포의 apoptosis를 유도하였으며, 세포 내에서 오래 잔류하지 않도록 하여 안정성을 높인 DNA 백신을 개발하고자 하였다. Minicircle DNA에 항원 유전자를 삽입하여 발현시키면 plasmid와 같은 양을 투여하여도 더 많은 양의 단백질을 오랫동안 발현시킬 수 있기 때문에 면역반응을 더 효과적으로 유도할 수 있다. 하지만 본 연구에서 G와 M 유전자를 동시에 발현시키는 plasmid로 glycoprotein에 의해 면역반응을 유도하면서도 오래 잔류하지 않도록 하여 plasmid 자체로도 안전성을 높인 DNA 백신을 만들고자 하였으나, plasmid 및 minicircle DNA가 소실되는 속도가 예상보다 빠르게 나타나 체액성 면역 반응을 일으키기에 부족하다고 생각된다. 따라서 M 유전자를 포함하는 DNA 백신으로 *in vivo*에서의 항체 생성을 확인할 필요가 있다고 생각된다. 또한 공격 실험을 통한 병원체에 대한 방어효과를 확인한 후 DNA 백신의 molecular adjuvant로써 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

DNA 백신은 많은 연구가 진행되고 있는 백신 중 하나로, 외부 항원 단백질 발현을 유도하여 세포성 및 체액성 면역반응을 동시에 유도할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 스쿠티카증의 원인 섬모충인 *Miamiensis avidus*와 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (VHSV)에 대한 DNA 백신을 개발하여 양식산 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 치어에서 생체 내 방어 효과를 보고자 하였다. 또한 minicircle DNA를 이용하여 생체 내에서의 안전성을 높인 DNA 백신을 제작하고자 하였다.

첫 번째로 스쿠티카증에 대한 실험을 진행하였는데, *M. avidus*는 양식산 넙치에 심각한 피해를 일으키며 아직 효과적인 백신이 개발되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 스쿠티카증에 대한 DNA 백신을 개발하여 방어 효과를 기대하고자 하였다. 백신은 *M. avidus*의 항원 유전자인 leucine-rich repeat protein (LRR)를 선정하였으며, 숙주 내에서 면역원성을 높이기 위하여 항원의 C-terminal과 N-terminal 말단에 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (VHSV) glycoprotein의 secretion signal peptide (vGsp)와 *Vibrio anguillarum*의 flagellin-A (FlaA)를 fusion하였다. 따라서 pcDNA 3.1(+) plasmid에 각 항원 유전자를 삽입하여 총 3가지 조합의 DNA 백신 vector를 제작하였으며, enhanced green fluorescent protein (EGFP)을 control로 사용하였다 (pc-L, pc-VL, pc-VLF, pc-EGFP). DNA 백신은 넙치 치어에 각 10 μ g씩 근육 주사하였으며, 주사 3주 후 공격 실험을 실시하였다. 공격 실험 후 14일간 점진적인 폐사가 나타났으며, pc-VL 및 pc-VLF group에서 다른 group에 비해 낮은 폐사율을 보였다. 따라서 vGsp와 FlaA의 조합으로 항원의

면역원성이 증가하였음을 알 수 있다.

두 번째로, 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 백신 실험을 진행하였다. DNA 백신은 어떤 항원을 선정하느냐에 따라서 그 효과가 상당히 차이가 나는데, 대표적으로 VHSV가 속한 rhabdovirus의 glycoprotein (G)이 잘 알려진 항원 중 하나이며 이미 많은 선행 연구에 의해 그 효과가 입증되었다. 본 연구에서는 microRNA (miRNA)를 DNA 백신의 molecular adjuvant로 사용함으로써 백신 효과 및 면역반응을 높이고자 하였다. miRNA는 small non-coding RNA로, mRNA에 결합하여 유전자 발현을 조절하며 그 종류가 매우 다양하다. miR-155는 넵치에서 발현되는 miRNA로, 본 연구의 molecular adjuvant로 사용하였다. 따라서 VHSV의 G gene만을 발현하는 vector와 miR-155를 동시에 발현하는 vector 두 종류를 사용하였으며, empty plasmid를 control로 사용하였다 (pFC-vG, pFC-vG-miR155). pFC-vG-miR155 vector는 *in vitro*에서 eukaryotic cell에 형질주입한 후 real-time RT-PCR을 통해 발현을 확인하였다. 제작한 DNA 백신은 넵치 치어에 10 μ g과 1 μ g씩 근육 주사하여 각각 실험하였다. Plasmid 10 μ g을 주사한 후 시간대 (3일, 7일, 2주, 4주)마다 virucidal activity를 실시하였으며, plasmid 10 μ g 및 1 μ g을 주사한 후 4주차에 neutralization test를 실시하였다. 또한 백신 주사 4주 후에 VHSV 공격 실험을 진행하였으며, 3주간 폐사를 관찰하였다. 10 μ g의 plasmid를 주사한 실험 결과, 낮은 농도로 공격 실험을 하였을 때는 대조군에서 60 % 이상의 폐사가 나타났으며, pFC-vG 및 pFC-vG-miR155 group에서는 폐사가 일어나지 않았다. 높은 농도로 공격실험을 하였을 때 역시 대조군에서 높은 폐사율을 나타냈으며, 실험군은 20 % 이하로 폐사가 거의 일어나지 않은 것으로 보아 높은 방어효과를 나타냈다고 할 수 있다. 1 μ g의 plasmid를 주사한 실험 결과도 같은 경향을 나타냈다. VHSV 및

HIRRV로 virucidal activity를 실시하였을 때, VHSV는 3일차에서 2주차, 4주차까지 수치가 증가하는 경향을 보였지만 HIRRV는 3일차에 비해 7일차에서 감소하였으나, 2주차 및 4주차에서는 7일차와 차이가 없었다. 그리고 VHSV의 경우 3일, 2주 및 4주차 모두 pFC-vG와 pFC-vG-miR155 group이 대조군에 비해 높은 반응을 나타낸 반면, HIRRV는 3일차에서 pFC-vG-miR155 group만이 높은 반응을 나타냈다. 따라서 3일차에는 초기 면역 반응에 의해 보체가 활성화되어 VHSV와 HIRRV 둘 다 방어효과를 나타내었으며, 시간이 지날수록 체액성 면역 반응으로 VHSV에 대해서만 방어 효과를 확인할 수 있었다. 또한 neutralization test 결과 두 실험군이 비슷한 수치를 나타냈으며 모두 항체가 생성되었음을 알 수 있었다. 따라서 체액성 적응 면역 반응이 유도되었으며, VHSV의 감염에 대해 적은 양의 plasmid로도 효과적으로 방어할 수 있음을 확인하였다.

마지막으로, DNA 백신은 다른 백신에 비해 제작이 비교적 쉬우며 보관이 용이하다는 장점이 있지만 이에 따른 백신의 여러 가지 안정성 문제 또한 제기되고 있다. Minicircle DNA는 외래 유전자를 발현할 수 있는 최소한의 구성 요소로 이루어진 DNA로, plasmid에 존재하는 replication origin 및 항생제 내성 유전자가 포함되어있지 않으며 외부 유전자를 지속적으로 발현할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 VHSV의 glycoprotein (G)과 matrix protein (M)을 발현하는 minicircle DNA를 만들어, zebrafish 내에서 plasmid persistence를 real-time PCR을 사용하여 분석하였다. VHSV의 M gene은 세포의 apoptosis에 관여한다고 알려져 있으며, 따라서 세포 내에 plasmid가 오래 잔류하지 않도록 하였다. Minicircle은 bacterial backbone이 존재하는 parental plasmid를 제작한 후, minicircle DNA 생산 균주인 ZYCY10P3S2T *Escherichia coli*에 형질전환

함으로써 제작하였다. DNA 백신은 G와 M gene을 각각 발현하는 vector와 동시에 발현하는 vector를 제작하였으며 EGFP를 control로 사용하였고, parental plasmid (pG, pM, pMG, pEGFP)와 minicircle DNA (Gmc, Mmc, MGmc, EGFPmc) 두 가지 형태로 준비하였다. DNA 백신은 zebrafish의 근육에 각 1 μ g 씩 주사하였으며, 주사 후 시간대 (1주, 4주, 6주, 8주)마다 주사 부위의 근육에서 plasmid persistence를 분석하였다. 실험결과, EGFP와 G group의 경우 zebrafish 내에서 plasmid보다 minicircle DNA가 더 오래 지속된 반면 M과 MG group의 경우 오히려 plasmid가 minicircle DNA에 비해 오래 지속되는 상반된 경향을 나타냈다. 이는 상대적으로 크기가 작은 minicircle DNA는 더 많은 copy 수가 들어가게 되고, 따라서 더 많은 양의 matrix protein이 발현되면서 빠른 속도로 apoptosis가 일어났기 때문이라고 생각된다.

스쿠티카증 및 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 두 DNA 백신 실험 모두 *in vivo* 실험을 통하여 항원에 대한 방어 효과를 확인할 수 있었고, VHSV에 대한 DNA 백신의 경우 항원에 대한 항체가 생성되었음을 확인하였다. 또한 immunostimulant 및 molecular adjuvant의 사용으로 숙주의 면역 반응을 자극함으로써 그 효과를 혈청 분석으로 확인하였으며, 추후 이러한 숙주의 면역 반응을 유도하는 항원들의 작용 메커니즘에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. Minicircle DNA를 이용한 백신 실험의 경우 *in vivo*에서의 공격 실험을 통하여 방어 효과를 확인할 필요가 있으며, matrix protein의 molecular adjuvant로서의 가능성을 제시하였다.

감사의 글

아무것도 모르는 학부생 때부터 시작한 3년 반이 넘는 실험실 생활을 마무리하고, 아직 많이 부족하다고 생각되는 제가 벌써 대학원 졸업을 앞두고 있습니다. 함께한 시간이 길었기 때문에 떠날 때의 허전함 또한 크고 더 아쉬운 것 같습니다. 지금 돌이켜보면 학부생 때 배울 기회가 많이 있었음에도 불구하고 그러지 않아 매우 아쉽다고 생각하지만, 학·석사 연계 과정으로 대학원을 진학한 만큼 더욱 열심히 실험에 매진하였기 때문에 후회되지는 않습니다. 공부하는 동안 제가 더욱 힘을 낼 수 있도록 옆에서 응원해주고, 격려해주신 분들께 감사의 인사를 전하고자 합니다.

먼저 부족한 저를 받아주시고 오랜 시간 지도해주신 김기홍 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 연구에 몰두하시는 교수님을 보면서 공부에 대한 열정이 대단하다고 느꼈으며, 제가 힘들 때 그러한 교수님을 보며 다시금 마음을 다잡아 열심히 할 수 있었습니다. 앞으로 사회에 나가서도 부끄럽지 않은 제자가 되도록 항상 노력하겠습니다. 또한 바쁘신 와중에도 제 논문을 심사해주시고 지도해주신 김도형 교수님과 정현도 교수님께도 감사의 인사를 전합니다. 학부과정과 석사과정 동안 제게 가르침을 주신 강주찬 교수님, 정준기 교수님, 허민도 교수님께도 감사드립니다.

3년 반이라는 시간이 짧게 느껴질 정도로, 많이 의지하고 재미있게 생활할 수 있게 해준 실험실원들에게도 감사의 말을 전합니다. 현실적인 조언을 해주시고 실험을 알려주신 승혁선배, 항상 다정하게 알려주시고 격려해주신 민선선배, 새내기 때부터 석사과정까지 저를 챙겨주시고 도와주신 선영선배, 실험에 대한 많은 질문에 친절하게 잘 알려준 Najib, 철없던 저를 다잡고 이끌어주신 세심한 준성선배, 같이 실험에 대해 의논하고 많은 것

을 배웠던 착한 정인언니, 함께 실험하고 고민하며 제가 실험에 대한 흥미를 가질 수 있게 해준 치즈언니, 평소에는 장난기 많지만 공부에 대한 의지가 확고한 민준선배, 같이 공부하고 장난치며 실험실의 분위기를 밝게 해준 명광선배, 몸은 약하지만 공부하고자 하는 정신력이 존경스러운 미정언니, 멀리까지 와서 새롭게 배우기시작한 소연언니, 아직 부족하지만 열심히 하려고 노력하는 동기 수연이, 선배들을 잘 챙겨주고 실험도 잘 하는 어른스러운 경민이, 짧은 기간이었지만 함께 공부하며 의지가 되었던 현욱선배, 동영선배, 보경이까지 고마운 마음을 전합니다. 또한 졸업자가 많은 와중에 심사 준비를 도와주시고 잘 챙겨주신 학과 조교 재민선배, 재영선배도 감사드립니다.

대학생활을 하면서 5년간 옆에서 함께 공부하고 웃으며 서로에게 의지가 된 지혜와 지수(구 현지), 선배로써 많이 챙겨주신 재민선배, 경식선배, 기태선배, 보미언니, 태준선배, 14학번 동기들 등 여기에 다 싣지 못한 많은 사람들에게도 감사의 인사를 드립니다.

마지막으로 제가 대학원을 진학할 때 반대하셨음에도 불구하고 끝까지 저를 믿어주시고 응원해주신 부모님과 제 동생 주영이 에게도 고마운 마음을 전합니다.

참 고 문 헌

- Alivernini, Stefano, et al. "MicroRNA-155-at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis." *Frontiers in Immunology* 8.1 (2017): 1932.
- Bela-ong, Dennis Berbulla, et al. "Involvement of two microRNAs in the early immune response to DNA vaccination against a fish rhabdovirus" *Vaccine* 33.28 (2015): 3215-3222.
- Byon, Ju Yong, et al. "Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination" *Fish & Shellfish Immunology* 18.2 (2005): 135-147.
- Catanese, DJ, et al. "Supercoiled Minivector DNA resists shear forces associated with gene therapy delivery" *Gene Therapy* 19.1 (2012): 94-100.
- Chen, Zhi-Ying, Cheng-Yi He, Anja Ehrhardt, and Mark A Kay. "Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*" *Molecular Therapy* 8.3 (2003): 495-500.

Chiou, Pinwen P., et al. "Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Matrix Protein Inhibits Host-Directed Gene Expression and Induces Morphological Changes of Apoptosis in Cell Cultures[†] " *Journal of Virology* 74.16 (2000): 7619–7627.

Corbeil, S, S.E. LaPatra, E.D. Anderson, and G. Kurath. "Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus" *Vaccine* 18.25 (2000); 2817–2824.

Devault, A., and Anne-Laure Bañuls. "The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: differential evolution by positive selection and recombination" *BMC Evolutionary Biology* 8.1 (2008): 292.

Dietz, Wynette M, et al. "Minicircle DNA is Superior to Plasmid DNA in Eliciting Antigen-specific CD8⁺ T-cell Responses" *Molecular Therapy* 21.8 (2013): 1526–1536.

FDA. "Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy" U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (1998).

Gupta, S.K., et al. "Flagellin A Toll-Like Receptor 5 Agonist as an Adjuvant in Chicken Vaccines" *Clinical and Vaccine Immunology* 21.3

(2014): 261–270.

Jose Priya, T.A., et al. “Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *cryptocaryon irritans* infection” Vaccine 30.5 (2012): 893–903.

Kapp, Katja, et al. “Post-Targeting Functions of Signal Peptides” Landes Bioscience 2.1 (2009): 913–918.

Kassis, Raïd, et al. “Lyssavirus Matrix Protein Induces Apoptosis by a TRAIL-Dependent Mechanism Involving Caspase-8 Activation” Journal of Virology 78.12 (2004): 6543–6555.

Kay, Mark A., Cheng-Yi He, and Zhi-Ying Chen. “A Simple And Rapid Minicircle DNA Vector Manufacturing System” Nature Biotechnology 28.12 (2010): 1287–1289.

Ke, Qi, et al. “Role of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Matrix (M) Protein in Suppressing Host Transcription” Journal of Virology 91.19 (2017): e00279–17.

Kim, Min Sun, Dong Soo Kim, and Ki Hong Kim. “Generation and characterization of NV gene-knockout recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype IVa” Diseases of aquatic organisms 97.11 (2011): 25–35.

Kopecky, Sarah A., and Douglas S. Lyles. "Contrasting Effects of Matrix Protein on Apoptosis in HeLa and BHK Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus Are due to Inhibition of Host Gene Expression" *Journal of Virology* 77.8 (2003): 4658-4669.

Lazarte, Jassy Mary S., et al. "Enhancement of glycoprotein-based DNA vaccine for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) via addition of the molecular adjuvant, DDX41" *Fish & Shellfish Immunology* 62.3 (2017): 356-365.

Lee, Eun Hye, and Ki Hong Kim. "Development of vaccines against scuticociliatosis caused by *Philasterides dicentrachi* (Ciliophora: Scuticociliatia)" (2009).

Li, Congcong, et al. "Molecular characterisation of porcine miR-155 and its regulatory roles in the TLR3/TLR4 pathways" *Developmental & Comparative Immunology* 39.1-2 (2013): 110-116.

Li, Lei, and Nikolai Petrovsky. "Molecular Adjuvants for DNA Vaccines" *Current issues in molecular biology* 22.9 (2016): 17-40

Lorenzen, N., et al. "Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination" *Fish & Shellfish Immunology* 8.4 (1998): 261-270.

Louise, von Gersdorff Jørgensen, et al. “Approaches towards DNA Vaccination against a Skin Ciliate Parasite in Fish” PLoS ONE 7.11 (2012): e48129.

Martoglio, Bruno, and Bernhard Dobberstein. “Signal sequences: more than just greasy peptides” Trends in Cell Biology 8.10 (1998): 410–415.

Milton, D.L., et al. “Flagellin A Is Essential for the Virulence of *Vibrio anguillarum*” Journal of Bacteriology 178.5 (1996): 1310–1319.

Munye, Mustafa M., et al. “Minicircle DNA Provides Enhanced and Prolonged Transgene Expression Following Airway Gene Transfer” Scientific Reports 6.3 (2016): 23125.

Najib, A., and Ki Hong Kim. “Profiling of microRNAs in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and *Epithelioma papulosum cyprini* cells following viral hemorrhagic septicemia virus infection, and functional characterization of miR-146a, miR-155 and miR-210” (2018).

Najib, A., et al. “Changes in microRNAs expression profile of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection” Fish & Shellfish Immunology 51.3 (2016): 384–391.

Nürnberg, T., et al. "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences" *Immunol Rev* 198.4 (2004): 249-266.

Pareek, S., et al. "miR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses" *Journal of Neuroinflammation* 11.5 (2014): 97.

Rodriguez, A., et al. "Requirement of *bic/microRNA-155* for Normal Immune Function" *Science* 316.5824 (2007): 608-611.

Stenler, Sofia, et al. "Micro-minicircle Gene Therapy: Implications of Size on Fermentation, Complexation, Shearing Resistance, and Expression" *Molecular Therapy-Neucleic Acids* 3.1 (2014): e140.

Vandermeulen, Gaëlle, Corinne Marie, Daniel Scherman and Véronique Pr  at. "New Generation of Plasmid Backbones Devoid of Antibiotic Resistance Marker for Gene Therapy Trials" *Molecular Therapy* 19.11 (2011): 1942-1949.

Wang, P., et al. "Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1" *Journal of Immunology* 185.10 (2010): 6226-6233.

Woo, Patrick T.K. “Immunological and Therapeutic Strategies against Salmonid Cryptobiosis” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.8 (2010): 341783.

Zhao, N., et al. “Transfection of shRNA-encoding Minivector DNA of a few hundred base pairs to regulate gene expression in lymphoma cells” *Gene Therapy* 18.3 (2011): 220-224.

