

초어톨류사접수체3(TLR3)유전자의 발현특성

조금란, 강철호, 장성훈

면역관련유전자의 발현특성을 밝히는것은 해당 유전자의 기능을 깊이있게 해명하고 실천에 도입하는데 필요한 기초자료를 마련하는데서 큰 의의를 가진다.

우리는 초어의 선천성면역조절에서 중요한 역할을 하는 TLR3유전자의 mRNA발현에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

실험에 리용된 프라이머들은 Primer premier 5.0프로그램으로 설계하였다.

반정량RT-PCR(sqRT-PCR)법[1]으로 각이한 조직들과 병원체에 감염된 조직들에서 감염시간에 따르는 초어TLR3유전자와 핵인자(NF-kB), 종양괴사인자(TNF- α)의 mRNA발현량을 분석하였다.

β 악틴은 cDNA량을 표준화하기 위한 내부대조로서 리용하였다. β 악틴유전자를 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머는 상류프라이머인 Qb-actinF와 하류프라이머인 Qb-actinR이다.(표) 초어TLR3유전자의 발현은 상류프라이머 TF192와 하류프라이머 TR193을 리용하여 검출하였다.(표)

표. 초어TLR3유전자의 발현검사에 리용한 프라이머

프라이머이름	배열(5'→3')	증폭길이(nt)와 용도
TF192(상류)	ACCAGGTAATGGAGAACAATCG	129, tlr3발현분석
TR193(하류)	GCCAGTAGAGAACACAGCGAG	
QTNF- α -F(상류)	CATCCATTTAACAGGTGCATAC	120, TNF- α 발현
QTNF- α -R(하류)	GCAGCAGATGTGGAAAGAGAC	
QNK-IF(상류)	GGCAGATGTAAACGCAAAG	180, NF-kB2발현
QNK-IR(하류)	GCCGAAGGTCAGGTGGTA	
Qb-actinF(상류)	GATGATGAAATTGCCGCACTG	134, β 악틴발현
Qb-actinR(하류)	ACCAACCATGACACCCTGATGT	

시험에 리용된 초어의 몸질량은 25~30g이었다. 초어출혈성비루스로 감염시키기 전에 물고기들을 산소(물온도 28°C)를 불어넣는 1 000L들이 수조에 넣고 매일 2회씩 배합먹이(단백질 32%, 당질 63%, 기름질 3%, 기타 2%)를 먹이면서 1주일정도 키웠다. 이 과정에 병에 걸리거나 기계적상처를 입은 개체는 취하지 않고 건강한 개체들을 골라 실험에 리용하였다.

시험구의 개체들에는 초어출혈성비루스(GCRV)를 PBS용액에 현탁시킨 10 μ L의 비루스용액(2 \times 10⁸PFU/g)을 복강에 주사하였으며 대조개체에는 PBS용액을 몸질량 1g당 10 μ L 되게 주사하였다. 감염후 1, 2, 3, 4, 5, 6일에 각각 3마리씩 선택하고 두신과 비장과 같은 조직들을 채취하여 총RNA분리에 리용하였다.

결과 및 논의

1) 초어TLR3 mRNA의 조직별발현특성

건강한 초어의 여러가지 조직들에서 초어TLR3유전자의 발현을 분석한데 의하면 두신과 비장에서 발현량이 가장 높았으며 아가미와 뱀, 신장, 피부에서 뚜렷한 발현띠를 볼 수 있었다. 그러나 뇌수와 란소, 근육, 간장에서는 눈에 띄이는 발현띠가 나타나지 않았다.(그림 1) 이것은 초어TLR3유전자가 두신이나 비장과 같은 면역관련조직들에서 강하게

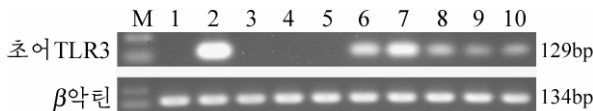


그림 1. 건강한 초어에서 TLR3 mRNA의 조직별발현분포

M은 100bp 분자량표식자, 1-뇌수, 2-두신, 3-란소, 4-근육, 5-간장, 6-아가미, 7-비장, 8-뱀, 9-신장, 10-피부

발현되며 아가미와 뱀, 피부와 같이 병원체와 직접적으로 접촉하는 조직들에서도 발현된다는것을 보여준다.

물고기류에서는 현재까지 여러종의 물고기들에서 TLR3유전자가 밝혀졌지만 줄말고기와 칠색송어에서만 발현에 대한 연구결과들이 발표되고 다른 물고기들에서는 밝혀지지 않았다. 칠색송어에서

TLR3유전자는 두신과 신장, 간장, 뱀에서 강하게 발현된다.[2] 줄말고기의 TLR3유전자는 아가미와 심장, 비장, 신장, 간장, 뇌수의 순서로 발현량이 높다.[3] 이것은 초어를 비롯한 물고기들에서 TLR3유전자가 두신과 비장, 신장과 같은 면역기관들과 아가미나 뱀, 피부와 같이 병원체와 직접적으로 접촉하는 기관들, 심장이나 혈액과 같은 혈액순환기관들에서 발현되며 따라서 바이러스와 같은 병원체들을 식별하는데 리용할수 있다는것을 보여준다.

2) 바이러스에 감염된 초어의 TLR3 mRNA발현변화특성

초어출혈성비루스에 감염된 초어에서 TLR3 mRNA의 발현변화 초어출혈성비루스를 일정한 농도로 초어의 복강에 주사한 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6일에 두신에서 총RNA를 분리하고 역전사한 다음 초어TLR3 mRNA의 발현수준을 반정량RT-PCR(sqRT-PCR)법으로 분석하였다.

초어TLR3 mRNA의 발현은 감염후 2일부터 증가하기 시작하여 3일만에 최대로 되었으며 4일부터 감소하기 시작하여 5, 6일에는 매우 낮아졌다.

초어출혈성비루스로 감염시킨 후 톨류사접수체신호통로에서 중요한 역할을 하는 핵인자(NF-kB)의 발현은 감염후 2일부터 증가하기 시작하여 3일에 최대로 되었다. 염증성시토카인인 종양괴사인자(TNF-α)의 발현량은 감염후 4일만에 최대로 되었다.(그림 2) 이것은 포유동물의 TLR3접수체와 같이 초어TLR3접수체가 초어출혈성비루스를 특이하게 인식하며 그 발현에 의하여 TLR3접수체신호통로가 활성화되면서 결국 염증성시토카인들의 분비가 강화되었다는것을 말해준다.

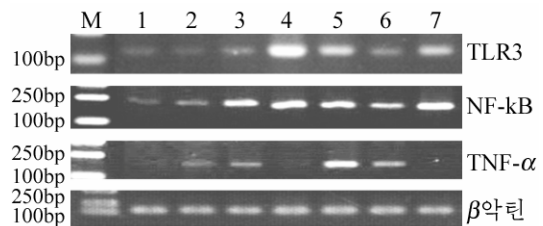


그림 2. 초어출혈성비루스(GCRV)로 감염시킨 후 두신에서 초어TLR3, 핵인자(NF-kB), 종양괴사인자(TNF-α)의 mRNA발현변화
M은 분자량표식자(DL2000), 1-7은 감염후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6일에 감염개체와 대조개체가운데서 각각 4마리씩 채취하여 분석한 결과임

폴리이노신데옥시시리딜산을 주사한 초어에서 TLR3 mRNA의 발현변화 폴리이노신데옥시시리딜산[Poly(I:C)]은 두오리사슬RNA의 유사물이며 바이러스복제때에 나타나는 두오리

사슬RNA(ds RNA)를 대용하여 비루스감염에 대한 실험에서 자주 이용된다.[4] 건강한 초어에 폴리이노신데옥시시티딜산을 주사한 후 두신에서 12h만에 TLR3 mRNA의 발현량이 최대로 높아졌으며 36h까지 높은 발현량을 유지하다가 감소하는 경향성이 나타났다.(그림 3)

실험결과들은 초어와 같은 물고기류에서 포유동물에서와 마찬가지로 TLR3이 두오리사슬RNA비루스인 초어출혈성비루스(GCRV)를 효과적으로 인식하는 기능을 수행한다는 것을 보여준다.

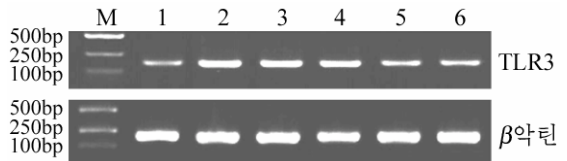


그림 3. 폴리이노신데옥시시티딜산으로 감염된 초어에서 TLR3 mRNA의 발현변화
M은 분자량표식자(DL2000), 1-6은 감염 후 0, 12, 24, 36, 48, 60h에 분석한 결과임

맺는 말

1) 건강한 초어의 여러가지 조직들에서 TLR3유전자는 두신과 비장, 신장과 같은 면역기관들에서 강하게 발현되며 아가미나 뱃, 피부와 같이 병원체와 직접적으로 접촉하는 기관들, 심장이나 혈액과 같은 혈액순환기관들에서도 발현된다.

2) 초어출혈성비루스와 폴리이노신데옥시시티딜산에 감염된 초어의 두신에서 TLR3과 핵인자, 종양괴사인자의 발현은 감염일수가 늘어남에 따라 증가하는데 일정한 기간에 최대로 되었다가 그후에는 감소한다.

참고 문헌

- [1] J. R. Sambrook; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 11~25, 2001.
- [2] M. F. Rodriguez et al.; Immunogenetics, 57, 510, 2005.
- [3] J. Lee; Curr Opin Gastroenterol, 23, 27, 2007.
- [4] S. Jang et al.; Developmental and Comparative Immunology, 38, 383, 2014.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Expression of Grass Carp Toll-Like Receptor3(TLR3) Gene

Jo Kum Ran, Kang Chol Ho and Jang Song Hun

Expression of the TLR3 gene from grass carp was detected in a wide variety of tissues of grass carp, showing a higher intensity in the head kidney, spleen, middle kidney, which was related with immune immunity, and middle intensity in the gill, intestine, skin, which contacted with pathogens, and lower intensity in the heart, blood cells, which was the blood circularly organ. The mRNA expressions of TLR3, NF- κ B, TNF- α in head kidney from grass carp challenged with GCRV and Poly(I:C) were up-regulated according the challenge time and peaked in proper time, and then down-regulated.

Key words: grass carp, toll-like receptor 3, TLR3, GCRV, Poly(I:C), pathogen