

## 아가미썩음병균에 감염된 초어에서 톨류사접수체 5(*tlr5*)와 그 신호통로유전자들의 발현특성

장성훈, 지명환

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우자면 발전된 과학기술을 받아들이는것과 함께 새로운 과학기술분야를 개척하고 그 성과를 인민경제에 적극 받아들여야 합니다.》  
(《김정일선집》 증보판 제11권 138~139페이지)

톨류사접수체5(Toll-like receptor5: TLR5)유전자는 세균의 편모를 인식하고 염증성세포인자들을 발현시켜 병원성세균에 대한 선천성면역을 일으키는 접수체로 알려졌지만 세균감염때 이 접수체의 발현에 대한 연구들은 거의 진행되지 못하였다.

우리는 초어를 연구대상으로 하여 물고기의 선천성면역에서 중요한 역할을 하는 *tlr5a*, *tlr5b*와 그 신호통로유전자들의 발현특성을 연구하였다.

### 재료와 방법

재료로는 전문종어사업소에서 기르고있는 1년생 초어새끼고기를 리용하였는데 몸질량은 27.1~31.8g이며 몸길이는 11.3~11.8cm였다.

아가미썩음병균(*Flavobacterium columnare*)은 아가미썩음병에 걸린 초어개체에서 분리하여 리용하였다.

총RNA는 선행연구[1]에 준하여 트리졸법으로 분리하였다. 건강한 초어의 간장과 뇌수, 아가미, 심장, 두신, 뱀, 신장, 근육, 비장을 취하여 총RNA를 분리한 다음 역전사시켜 조직별발현분석을 위한 출발재료로 리용하였다.

아가미썩음병균은 다음과 같은 방법으로 감염시켰다.

아가미썩음병균을  $2 \times 10^8$  CFU/mL의 농도로 첨가한 45L의 수조에 30마리의 물고기를 60min동안 잠그었다가 꺼내어 1 000L들이 수조에 넣었다. 대조구의 물고기는 아가미썩음병균을 넣지 않은 동일한 조건에 방치하였다. 감염후 0, 12, 24, 36, 48, 60h에 감염된 개체들과 대조구의 개체들을 취하고 중간뱀을 떼내어 실험재료로 하였다. 매번 세마리의 물고기를 시료로 취하였다.

mRNA발현량은 실시간정량역전사PCR법(qRT-PCR)으로 분석하였다.

각이한 조직들과 감염상태에서 반정량분석은 선행방법[2]으로 하였으며 qRT-PCR분석에는 ABI실시간정량분석기(《Applied Biosystems》)를 리용하였다.

qRT-PCR의 반응액조성은 다음과 같다.

cDNA 1 $\mu$ L, 증류수 8 $\mu$ L, SYBR형광색소(《Toyobo》) 10 $\mu$ L, 프라이머(5 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ L.

PCR증폭조건은 다음과 같다.

95°C에서 예비변성 2min→40회전의 95°C에서 변성 25s, 60°C에서 아닐링 30s, 72°C에서 연장 1min→72°C에서 최종연장 10min.

발현분석에 리용한 프라이머는 Primer premier 5.0프로그램으로 설계하였다.(표)

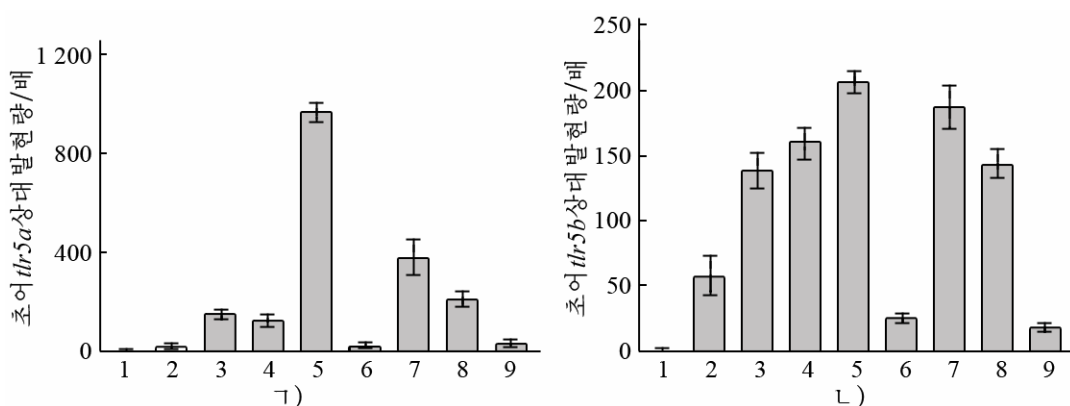
표. 유전자들의 발현분석에 리용한 프라이머

프라이머	배열(5'→3')	증폭부위
Q $\beta$ -actin-F	AGCCATCCTTCTTGGGTATG	$\beta$ -actin발현
Q $\beta$ -actin-R	GGTGGGGCGATGATCTTGAT	
MyQF	TGGAGGACTGTCGCCGAAATG	MyD88발현
MyQR	TGTGGCCTCTGGACGAGTTTC	
QTNF- $\alpha$ -F	CATCCATTAAACAGGTGCATAC	TNF- $\alpha$ 발현
QTNF- $\alpha$ -R	GCAGCAGATGTGGAAAGAGAC	
QIL-1 $\beta$ -F	GATTCGAAAGTTCGATTCAATCT	IL-1 $\beta$ 발현
QIL-1 $\beta$ -R	TTCAGTGACCTCCTTCAAGAC	
QNK-IF	GGCAGATGTAAACGCAAAG	NF- $\kappa$ B2발현
QNK-IR	GCCGAAGGTCAGGTGGTA	
Qt5aF	TGACGCAGCAAATGTTCAAGC	tlr5a발현
Qt5aR	GAGAACCTGGGAGCAAAGCAA	
Qt5bF	CATTATCTCATGTTTCCTATG	tlr5b발현
Qt5bR	GTTGAAGATGTTAAGATTTTGC	

## 결과 및 고찰

### 1) 초어*tlr5a*, *tlr5b* mRNA의 조직별발현특성

실시간정량RT-PCR법으로 건강한 초어의 각이한 조직들에서 초어*tlr5a*의 mRNA발현을 분석한데 의하면 두신과 신장에서 발현량이 제일 높았고 다음은 근육, 아가미, 심장에서 높았으며 간장과 뇌수, 뱀, 비장에서는 발현량이 낮았다. 마찬가지로 건강한 초어의 각이한 조직들에서 초어*tlr5b*의 mRNA발현을 분석한데 의하면 두신과 신장, 근육, 아가미와 심장에서 발현량이 높아졌다.(그림 1)


 그림 1. 초어의 각이한 조직들에서 *tlr5a*, *tlr5b* mRNA의 상대발현량

 ㄱ) *tlr5a*, ㄴ) *tlr5b*; 1-간장, 2-뇌수, 3-아가미, 4-심장,

5-두신, 6-뱀, 7-신장, 8-근육, 9-비장

초어*tlr5a*와 *tlr5b*의 조직별발현이 류사한 경향성을 띠는것은 이 유전자들의 구조가 비슷하고 그 기능 역시 거의 류사하다[1, 2]는것을 보여준다.

초어*tlr5a*, *tlr5b*가 두신이나 비장과 같은 면역기관뿐만아니라 병원체와 직접적으로 접촉하는 아가미나 근육에서 많이 발현된다는것은 이 유전자가 포유동물에서와 마찬가지로

세균면역과 관련된 기능을 수행할수 있다는것을 보여준다.

물고기류에서는 현재까지 줄말고기와 자치보가지 등의 물고기들에서 TLR5유전자들이 밝혀졌[3]지만 그 발현에 대한 연구는 잘 진행되지 않았다.

## 2) 아가미씩음병균으로 감염시킨 초어에서 *tlr5a*, *tlr5b*의 발현변화특성

아가미씩음병균에 감염된 초어에서 *tlr5a*, *tlr5b*의 발현변화 아가미씩음병균으로 감염시킨 초어의 뱃에서 *tlr5a*, *tlr5b*의 mRNA발현변화를 분석하였다.(그림 2)

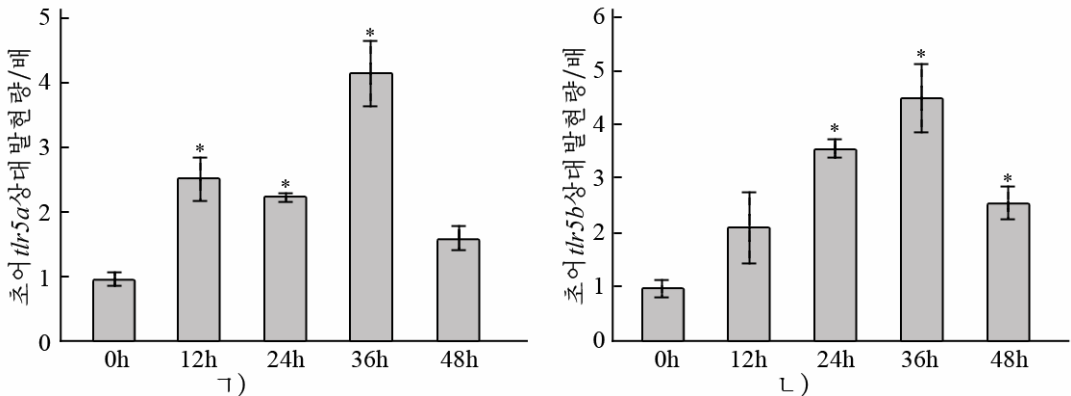


그림 2. 아가미씩음병균으로 감염된 초어에서 *tlr5a*, *tlr5b*의 mRNA발현변화  
 A) *tlr5a*, B) *tlr5b*

그림 2에서 보면 감염후 12h부터 *tlr5a*, *tlr5b*의 상대발현량이 명확히 높아졌는데 감염후 36h에 최대로 되었다가 낮아지는 경향성이 나타났다. 이것은 이 유전자들이 아가미씩음병균의 침입에 응답하는 기능을 가지고있다는것을 보여준다.

포유동물에서 *tlr5*가 세균의 편모를 효과적으로 인식하는 작용을 한다는것이 밝혀졌[3]지만 아가미씩음병균과 같은 그람음성세균을 인식한다는데 대해서는 현재까지 알려지지 않았다.

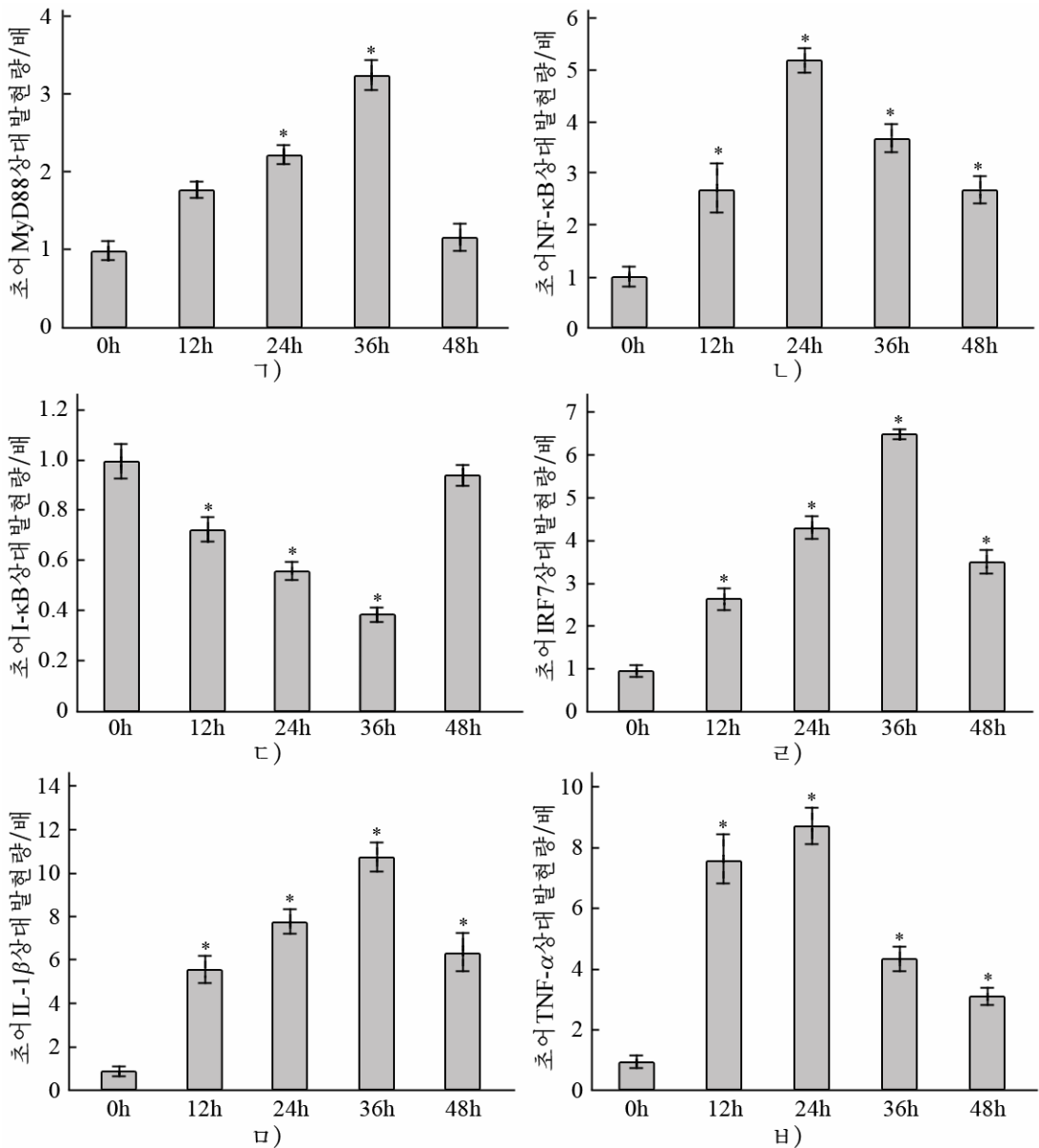
아가미씩음병균에 감염된 초어에서 *tlr*신호통로유전자들의 발현변화 초어*tlr5a*, *tlr5b*의 발현이 그 신호통로에 미치는 영향을 확정하기 위하여 TLR5와 직접 결합되는 MyD88(글수분화인자88)과 톨류사접수체신호통로에서 결정적역할을 하는 NF- $\kappa$ B(핵전사인자- $\kappa$ B), I- $\kappa$ B(핵전사인자억제인자), IRF7(인터페론조절인자7), 사이토카인류들인 IL-1 $\beta$ (인터로이킨-1 $\beta$ )와 TNF- $\alpha$ (종양괴사인자- $\alpha$ )의 시간별발현변화를 동시에 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 MyD88발현량은 감염후 12h부터 높아지기 시작하여 36h에 최대로 되었다가 48h에는 감소되기 시작하였다. NF- $\kappa$ B발현량은 감염후 12h부터 높아지기 시작하여 24~48h에는 높은 수준에서 유지된다는것을 알수 있다.

사이토카인의 일종인 IL-1 $\beta$ 의 발현량은 감염후 12h부터 높아지기 시작하여 36h에 최대로 되었다가 48h부터는 감소되기 시작하였으며 TNF- $\alpha$ 발현량은 감염후 12h부터 높아지기 시작하여 24h에는 최대로 되었다가 36h부터는 감소되기 시작하였다.

톨류사접수체신호통로에서 TLR5a, TLR5b와 직접적으로 결합되는 MyD88의 발현변화는 이 접수체유전자들의 발현변화와 류사한 경향성을 띠는데 이것은 접수체에 의하여 아가미씩음병균이 특이적으로 인식된 후 신호통로를 따라서 신호가 전달되어 염증성사이토카인들이 생겨난다는것을 보여준다.

톨류사접수체들의 신호통로에서 NF- $\kappa$ B는 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 신호


 그림 3. 아가미썩음병균에 감염된 초어에서 *tlr*신호통로인자유전자들의 mRNA발현변화

㉠) MyD88, ㉡) NF-κB, ㉢) I-κB, ㉣) IRF7, ㉤) IL-1β, ㉥) TNF-α

통로가 활성화되지 않았을 때 NF-κB는 I-κB와 결합되어 불활성화상태에 있다가 신호통로가 활성화되면 두 단백질사이의 결합이 해제되면서 유리상태로 된다. 다음 유리상태의 NF-κB는 핵막을 뚫고 핵속에 들어가며 게놈DNA의 특정한 위치에 결합되어 전사인자로 된다. 결과 사이토카인합성량이 높아지며 염증성반응이 일어난다.[2]

그림 3에서 보다싶이 감염후 24h부터 NF-κB발현량이 높은 수준에서 유지되는것은 TLR5a, TLR5b에 의하여 유도되는 신호통로가 활성화되었다는것을 보여주는 실험적증거로 된다.

또한 IL-1β, TNF-α와 같은 사이토카인들의 발현량이 늘어난다는것은 초어유기체에서 염증성반응이 진행된다[3]는 실험적증거로 된다.

이상의 실험을 통하여 우리는 아가미썩음병균에 감염된 초어에서 *tlr5a*, *tlr5b*의 발현이 시간에 따라 증가되며 신호통로관련유전자들과 사이토카인유전자들의 발현도 증가되어 전체 신호통로가 활성화된다는것을 확인하였다.

TLR5a, TLR5b의 발현량이 높아지면 종양괴사인자를 비롯한 염증성사이토카인들의 발현도 높아지는데 결과 감염된 초어는 병에 걸리며 지어는 염증에 의하여 죽는 현상이 나타난다.

## 맺 는 말

1) 건강한 초어에서 *tlr5a*, *tlr5b*는 두신이나 비장과 같은 면역기관뿐만아니라 병원체와 직접적으로 접촉하는 아가미나 근육에서 많이 발현된다.

2) 아가미썩음병균으로 감염시킨 후 초어*tlr5a*, *tlr5b*의 상대발현량은 현저히 높아진다.

3) 아가미썩음병균으로 감염시킨 후 *MyD88*, *NF-κB*, *IRF7*, *IL-1β*, *TNF-α*와 같은 TLR5 신호통로의 하류유전자들의 발현량도 현저히 높아지며 *I-κB*의 발현량은 낮아진다.

## 참 고 문 헌

[1] 손주성 등; 생물학, 2, 8, 주제105(2016).

[2] Y. Jiang et al.; Fish & Shellfish Immunology, 44, 88, 2015.

[3] N. E. Andersen et al.; Journal of Experimental Medicine, 204, 393, 2007.

주제109(2020)년 4월 5일 원고접수

## Expressions of the *tlr5s* and Signaling Pathway Genes from Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*, Infected with *Flavobacterium columnare*

Jang Song Hun, Ji Myong Hwan

Real-time quantitative PCR revealed *tlr5a* and *tlr5b* from grass carp were constitutively expressed in all examined tissues, much expressed in tissue including head kidney, spleen, gill and muscle. Following exposure to *Flavobacterium columnare*, *tlr5a* and *tlr5b* from grass carp were up-regulated significantly. Moreover, the downstream genes of TLR5 signal pathway such as *MyD88*, *NF-κB*, *IRF7*, *IL-1β* and *TNF-α* were also up-regulated significantly, whereas the *I-κB* gene was down-regulated, suggesting such a thing responsive to *Flavobacterium columnare* infection.

Keywords: grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, *tlr5*